

POIETIS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Laurence HUTTER

Optimisation des milieux de reconstruction 3D dans le procédé de fabrication par bio-impression d'un substitut dermo-épidermique

*Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle*

vendredi 8 octobre - 11h10 - Jury A

Culture cellulaire, Bio-impression 3D, Optimisation, Peau, Ingénierie Tissulaire, Milieux, Derme, Épiderme, Fibroblastes, Kératinocytes

Poietis est une PME de biotechnologies spécialisée dans la bio-impression assistée par laser. L'entreprise développe des bio-imprimantes permettant d'automatiser les technologies de bio-impression: la bio-impression micro-vanne, la bio-extrusion et la bio-impression assistée par laser. Cette dernière permet l'impression de haute résolution de cellules contenues dans des encres concentrées tout en maintenant une viabilité supérieure à 85%.

Avec ces technologies et la mise au point d'un procédé de fabrication d'une peau bio-imprimée Poieskin® Poietis a signé un partenariat avec l'AP-HM (Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille) dont l'objectif est la réalisation d'un premier essai clinique de greffe de peau bio-imprimée d'ici 2022. Ces substituts dermoépidermiques bio-imprimés sont considérés comme des médicaments de thérapie innovante pour la médecine régénératrice et leur fabrication doit donc répondre aux exigences des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). La bioimpression permet d'apporter de la reproductibilité dans la fabrication et donc de faciliter la validation du procédé. Les modèles actuels sont composés de collagène et des fibroblastes pour le derme et des kératinocytes pour l'épiderme.

L'objectif de ce projet de fin d'études est d'optimiser les milieux de cultures des trois phases permettant la maturation des substituts dermo-épidermiques bio-imprimés : la maturation du derme, ainsi que la maturation puis la différenciation de l'épiderme. L'optimisation doit respecter au maximum les exigences des BPFs pour les matières premières composants les milieux. La compréhension des mécanismes cellulaires de chaque phase ainsi que du rôle précis de chaque actif ont permis de mettre au point des milieux dont la composition permet son utilisation en phase de développement clinique tout en optimisant la qualité des reconstructions bio-imprimées.

PESSAC • FRANCE

10/5/2020 → 12/8/2021

Optimisation of 3D reconstruction culture medium for manufacturing a 3D bio-printed dermo-epidermal skin substitute

Détruit après soutenance

Cell Culture, 3D Bio-printing, Optimisation, Skin, Tissue engineering, Media, Dermis, Epidermis, Fibroblasts, Keratinocytes

Poietis is a biotechnological SME specialized in laser-assisted bioprinting. The company develops bioprinters enabling the automation of bio-printing technologies namely : micro-valve bioprinting, bioextrusion and laser-assisted bioprinting. The latter allows high resolution cell bioprinting with high cell density ink and with cell viability higher than 85%. With these technologies and the development of Poieskin® (a bio-printed skin substitute) manufacturing process, Poietis signed a partnership with the AP-HM (Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille) in order to start a first clinical trial for the evaluation of bioprinted skin substitute grafts by 2022. These bio-printed substitutes are considered as advanced therapy medicinal products (ATMPs) for regenerative medicine and their production ought to meet the Good Manufacturing Practices (GMP) requirements. Bio-printing brings reproductibility in the production thus helping process validation. As of now, models are composed of collagen and fibroblasts for the dermis and keratinocytes for epidermis.

The goal of this end-of-studies project is to optimise culture medium of the three stages permitting bioprinted dermo-epidermal substitutes maturation . These three stages being dermis maturation, epidermis maturation and epidermis differentiation. Medium optimisation has to follow as closely as possible GMPs guidelines for raw materials. The understanding of cellular mechanism as well as raw materials specific rôle at each stages have permitted to develop clinical grade medium while optimising the quality of bio-printed reconstructions.

Noémie
BIBAL

CP

CHEMICAL BIOLOGY

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Julien HIBLOT

Caractérisation biochimique et ingénierie de la sépiapterine réductase humaine dans le contexte de biosenseurs semi-synthétiques.

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

jeudi 7 octobre - 16h05 - Jury C

NAD⁺, NADP⁺, biosenseur, sépiapterine réductase, fluorophores, FRET

Le nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD⁺) et sa forme phosphorylée NADP⁺, sont des métabolites essentiels impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que le métabolisme redox, le métabolisme énergétique et les voies de signalisations. Du fait de leur rôle central, le métabolisme de ces cofacteurs est un sujet de recherche d'actualité. Le laboratoire du Prof. Johnsson a développé des biosenseurs semisynthétiques permettant de mesurer le ratio NADPH/NADP⁺ ou la concentration de NAD⁺ dans des cellules vivantes. Ces biosenseurs fonctionnent par FRET et consistent en la fusion d'une sépiapterine réductase humaine (SPR) fixant l'analyte, et de deux tags protéiques : Halo-Tag et SNAP-tag.

Ce projet couvre la caractérisation biochimique de SPR et l'ingénierie de variants catalytiquement inactifs. Les affinités de liaisons et les propriétés enzymatiques de SPR isolée et en context biosenseur ont été déterminées pour (i) la sépiapterine, (ii) les inhibiteurs de SPR et (iii) les cofacteurs ; par ITC et essais enzymatiques, respectivement. L'activité enzymatique de SPR a été conservée pour les variants fixant le NAD⁺ et n'a pas été affectée dans le contexte du biosenseur. L'introduction de la mutation D258A a supprimé l'activité enzymatique de tous les biosenseurs mais a également réduit l'affinité pour le cofacteur et la réponse du biosenseur.

Ces résultats permettront l'amélioration des biosenseurs à NAD(P) pour leur application dans des systèmes physiologiques pertinents (e.g. cellules primaires).

HEIDELBERG • ALLEMAGNE

2/15/2021 → 8/13/2021

Biochemical characterization and engineering of the human sepiapterin reductase in the context of semisynthetic biosensors

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

NAD⁺, NADP⁺, biosenseur, sepiapterin reductase, fluorophores, FRET

Nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD⁺) and its phosphorylated analogue NADP⁺ are essential cofactors that are involved in many biological processes including regulation of cellular redox state, energy metabolism and signalling pathways. The metabolism of these cofactors is a current research subject, as they have a central roles in health and disease. The Johnsson lab has developed semisynthetic biosensors for the measurement of NADPH/NADP⁺ or NAD⁺ in live cells. These FRETbased sensors are fusion proteins of the human sepiapterin reductase (SPR) as binding protein and two self-labelling proteins: Halo- and SNAP-tag.

This project covered the biochemical characterization of the SPR and the engineering of catalytically inactive variants. Binding affinities and catalytic properties of SPR and NAD(P)⁺ biosensors were determined for (i) sepiapterin, (ii) SPR inhibitors and (iii) cofactors by enzymatic assays and ITC. Enzymatic activity of SPR was conserved for the NAD⁺ variants and was unaffected by the sensor context. Introduction of a D258A mutation completely abolished the enzymatic activity for all constructs, but also decreased cofactor affinity and sensor response.

These results will facilitate further improvements of the NAD(P)⁺ biosensors to apply them to physiological relevant model systems (e.g. primary cells).

Estelle
BONEDEAU

Mobilité

RHODIA OPERATION

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Guillaume PIREAU

Optimisation du procédé USP de la vanilline naturelle

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 16h05 - Jury B

Fermentation ; études paramétriques ; croissance ; vanilline ; productivité

La vanilline est l'un des arômes les plus populaires dont la production naturelle par processus biotechnologique est en plein essor ces dernières années. Cet aldéhyde aromatique intéresse, notamment, les industries des aliments et des boissons, de la cosmétique ou encore de la parfumerie. Historiquement, Solvay a toujours eu une position de leader sur le marché de production de la vanilline, d'abord par voie synthétique, et aujourd'hui, à la fois par processus synthétique et naturel. Cette vanilline naturelle est produite par fermentation à partir d'une matière première naturelle.

Dans le but d'optimiser le procédé de bio production de la vanilline, l'équipe de fermentation de la Global Business Unit Aroma Performance de Solvay est chargée de réaliser des études paramétriques du procédé. En étudiant l'impact de la modification des paramètres et des conditions de culture sur la bio production de cet arôme, il est possible d'améliorer les performances et rendements de production, mais aussi de diminuer les coûts fixes, CAPEX, et coûts variables, OPEX.

Ainsi, au cours de ce projet de fin d'études, l'influence de diverses conditions de culture telles que la pO₂ appliquée lors de la croissance, le pH initial, la composition initiale du milieu de culture, qui sont connues pour influencer considérablement la production de métabolites chez de nombreux micro-organismes, a été étudiée. Ces études ont été réalisées en fermenteur 2 litres en mode batch. Les échantillons sont traités par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour calculer des critères de performance.

SAINT FONTS • FRANCE

3/8/2021 → 8/31/2021

Optimization of the USP process for natural vanillin

Détruit après soutenance

Fermentation ; parametric studies ; growth ; vanillin ; productivity

Vanillin is one of the most popular aromas whose natural production by biotechnological process has been growing rapidly in recent years. This aromatic aldehyde is of interest to foods and beverages, cosmetics or even perfume industries. Historically, Solvay always had a leading position in the vanillin production market, first by synthetic route, and today, both synthetic and natural process. This natural vanillin is produced by fermentation from a natural raw material.

In order to optimize the vanillin bio-production process, the fermentation team of Solvay's Global Business Unit Aroma Performance is responsible for carrying out parametric studies of the process. By changing the parameters and cultivation conditions on the bio-production of this aroma, it is possible to improve performances and production yields, but also to reduce fixed costs, CAPEX, and variable costs, OPEX.

Thus, during this end of studies project, the influence of various culture conditions such as the dissolved oxygen applied during growth, the initial pH, the initial composition of the culture medium, which are known to significantly influence the production of metabolites in many microorganisms has been studied. These studies were carried out in a 2-liter fermenter in batch mode. The samples are processed by high performance liquid chromatography (HPLC) to calculate performance criteria.

Emma
BRAULT
Classique

PHILIP MORRIS PRODUCTS SA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Jovan SIMICEVIC

Analyse protéomique comparative des espèces de microalgues vertes dans différentes conditions de croissance

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h50 - Jury A

Microalgue, Chlorella, Data-Independent Acquisition (DIA), Spectrométrie de Masse, Protéomique Quantitative

Ces dernières années, l'intérêt du monde scientifique envers les microalgues vertes s'est approfondi en raison de leurs nombreuses applications industrielles, notamment dans les domaines nutritionnel et pharmaceutique. Le but de ce stage d'utiliser la spectrométrie de masse pour déterminer les différences en quantité et en expression des protéines chez certaines espèces d'algues vertes ayant été cultivées dans des conditions de croissance différentes. Le projet a été développé en partenariat avec le Solar Energy Bio-Exploitation Laboratory de l'Université de Vérone (Italie). Des échantillons de microalgues ont été extraits, digérés et purifiés pour obtenir des peptides séparés par chromatographie (nanoLC) et analysés par un spectromètre de masse de type Orbitrap. Une méthode d'acquisition indépendante des données (DIA) a été utilisée pour déterminer la composition protéique et l'abondance différentielle des protéines pour les deux espèces afin de comparer les conditions de croissance. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de plusieurs outils statistiques. Les microalgues étudiées ont été cultivées dans un environnement aérobie soit avec une concentration en CO₂ atmosphérique soit avec une concentration enrichie en CO₂. La comparaison de ces conditions n'a montré aucune différence significative dans l'expression protéique malgré des différences au niveau de l'abondance protéique. Ces microalgues ont également été cultivées avec une exposition différentielle à la lumière. Plus de 300 protéines sont exprimées de manière différentielle pour une luminosité élevée en comparaison avec une faible luminosité. Parmi celles-ci, environ 20 protéines liées à la photosynthèse étaient deux fois moins abondantes lorsque les microorganismes sont exposés à une lumière intense, ce qui suggère que ces microalgues régulent l'expression des photosystèmes en fonction des conditions d'éclairage.

NEUCHÂTEL • SUISSE

3/1/2021 → 8/31/2021

Comparative proteomic analysis of green microalgae species under different growth condition

Détruit après soutenance

Microalgae, Chlorella, Data-Independent Acquisition (DIA), Mass Spectrometry (MS), Quantitative Proteomics

Recently, there has been a growing interest in marine microalgae extracts due to their numerous applications, particularly in the nutritional and pharmaceutical fields. Green microalgae are known for their significant protein content as well as for their numerous health benefits. This internship aimed to utilize mass spectrometry-based proteomics to unravel differences in protein amount and expression in selected green algae species that underwent differential growth conditions. The project was developed in partnership with the Solar Energy Bio-Exploitation Laboratory at the University of Verona (Italy). Microalgal samples were extracted, digested, and purified to obtain peptides, which were separated using nano liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by an Orbitrap mass spectrometer. A data independent acquisition (DIA) method was implemented to determine protein composition and differential protein abundance for the two species for condition comparison. Data analysis was performed using several statistical tools. Growth conditions tested encompassed green microalgae grown in an aerobic environment either under atmospheric CO₂ concentrations or CO₂-enriched. A direct comparison of the two conditions showed no significant differences in the expression of specific proteins despite differences in the overall protein abundances. Green microalgae were as well grown under differential light exposure. More than 300 proteins were differentially expressed under high light when compared to low light. Out of these, about 20 photosynthesis-related proteins were at least twofold less abundant when these microorganisms were exposed to high light, suggesting that these green microalgae adapt the photosystem energy flux, depending on the light conditions, by regulating the expression of these photosystem components.

Louise
CHAPUT

Classique

ALCIMED

PARIS • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Arielle de ROYER

3/1/2021 → 9/10/2021

Etude de marché portant sur le projet Pupilfreq, une nouvelle méthode de dépistage de maladies oculaires basée sur la mesure du diamètre pupillaire.

Market study on the Pupilfreq project, a new pupillometric method for the screening of visual pathologies using the pupillary response

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 10h05 - Jury D

Etude de marché – Marketing stratégique – Santé – Conseil – méthode de pupillométrie – ophtalmologie

Strategic marketing – Market study – Health – Consulting – Pupillometric method – ophthalmology

Elea
CHAUVEAU

Classique

Alcimed est un cabinet de conseil qui accompagne des acteurs publics ou privés à développer et à explorer leurs terres inconnues à l'international autour de 5 pans : les nouvelles technologies, les nouvelles offres (produits, services, business models), les nouvelles géographies, les futurs possibles et enfin les nouvelles manières d'innover. Alcimed intervient dans différents secteurs et notamment celui de la santé. Au sein du cabinet, de nombreux projets sont réalisés et j'ai notamment mené l'intégralité de quatre études de marché et un montage de dossier et relecture critique pour un projet de Recherche Hospitalo-Universitaire (RHU). Une étude de marché d'une durée de 8 semaines pour une société de transfert technologique m'a notamment été confiée afin de développer une nouvelle méthode de dépistage de maladies oculaires basée sur la mesure du diamètre pupillaire. Dans le cadre de cette étude, la société souhaitait avoir une vision objectivée du potentiel de la solution pour orienter ses futurs développements. L'objectif était donc d'analyser la réceptivité et le potentiel de la technologie afin de proposer une stratégie d'adaptation de l'offre aux besoins des utilisateurs et un plan d'action pour sa mise sur le marché. Une étude du potentiel de marché, une veille concurrentielle et l'analyse d'entretiens avec des leaders d'opinions et praticiens ont permis de répondre aux attentes de la mission.

Alcimed is a consulting company which helps public or private actors to explore and develop their uncharted territories in five areas: new technologies, new offers (products, services, business models), new geographies, possible futures, and new way to innovate. Alcimed works in plenty of sectors in particular health. Numerous projects are carried out at Alcimed and I was led to carry out 4 market studies and a dossier creation for a hospitalo-university research program. Among these, I have been working on an 8 week-study market for a technology transfer company to develop an innovative pupillometric method for the screening of visual pathologies based on the pupillary response. The company wanted to have an objective vision of the solution's potential for its future development. Thus, the main goal of this study was to analyse the technology potential and receptivity for setting up an adapting strategy of this offer to the needs of the users and an action plan in the target market. The success of this mission is based on several activities especially a study of the market potential, competitive intelligence and analysis of interviews with opinion leaders and physicians.

BIOMERIEUX

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Isabelle PACALLET

Gestion de projet RPA au sein d'une entreprise spécialisée dans le diagnostic in vitro

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 16h05 - Jury A

Amélioration continue, optimisation, automatisation, gestion de projet, conduite du changement.

Chez bioMérieux, leader sur le marché du diagnostic in vitro, je suis chargée de projets d'amélioration continue des processus documentaires pour optimiser l'expérience collaborateur. Le département PLD, Product Labeling & Documentation, est responsable de la documentation technique (Notices, manuels utilisateurs, supports CD et USB, étiquettes) qui accompagne l'ensemble des produits bioMérieux conformément aux réglementations en vigueur.

Au sein du PLD, j'ai eu l'opportunité de participer activement au projet RPA, Robotic Process Automation. L'objectif du RPA est d'automatiser des processus métiers répétitifs. La technologie RPA permet de programmer un logiciel informatique, surnommé "robot", capable de gérer et interpréter des données numériques dans différents systèmes pour exécuter un processus manuel de manière automatisée. L'automatisation de tâches répétitives permet un gain de temps et une amélioration de la performance organisationnelle en limitant les activités à faibles valeurs ajoutées pour les collaborateurs.

Dans le cadre du projet RPA, j'ai eu l'occasion de collaborer avec différentes fonctions comme les responsables qualité, IS et développeurs techniques. J'ai été responsable des livrables du projet (étude de faisabilité, évaluation de l'impact GxP, cahier des charges, URS) et j'ai contribué à la planification et la gestion de l'activité RPA pour le PLD.

En étant intégrée au PLD, j'ai pu être confrontée à l'ensemble des parties prenantes impliquées dans la gestion de la documentation technique et au cadre hautement réglementé de celle-ci. De plus, grâce à la mise en place d'ateliers de travail, j'ai co-construit avec les représentants PLD de nouveaux outils de suivi d'activité (tableau de suivi, indicateurs clés de performance) pour faciliter la gestion des projets. En plus de l'optimisation de certains processus, j'ai également participé à la réalisation d'une matrice RACI pour s'accorder sur les rôles et responsabilités de chacun.

CRAPONE • FRANCE

9/14/2020 → 11/30/2021

RPA Project Management within an in vitro diagnostic specialized company

Détruit après soutenance

Continuous improvement, optimization, automation, project management, change management

At bioMérieux, a global leader in in vitro diagnostics, I am currently supporting various continuous improvement projects related to the documentation system to improve internal collaborators' experience. The Product Labeling & Documentation (PLD) Department prepares the documentation (Instructions For Use, User manuals, media supports, labels) supplied with bioMérieux products in compliance with procedures and any specific requirements identified by Regulatory Affairs.

Integrated in PLD, I have seized the opportunity to be part of the RPA initiative. The objective of Robotic Process Automation is to automate repetitive system tasks. RPA tools enable us to set up a software, or a "robot", able to capture, interpret and deal with data across multiple applications in order to execute a process step by step autonomously. RPA delivers profitability while improving accuracy across the organization. Furthermore, RPA implemented on low added value tasks allows time saving and more reliable qualitative data. Consequently, collaborators are usually the first to appreciate the benefits of RPA as it removes non-value-add activities and relieves them from doing repetitive tasks.

As part of the RPA project, I am partnering with other teams such as Quality Assurance and IS teams. I am responsible for specific project deliverables (Feasibility study, GxP assessment, Process Design Document, User Requirement Specifications) and contributing towards the planning and management over RPA activities.

Being part of PLD makes me fully aware of the stakeholders implied in the management of quality documents in an environment confronted with regulatory and legal requirements. Furthermore, I have developed new management tools (Dashboards, Key Performance Indicators) that facilitate monitoring progress of projects (Change control, Documentation Creation, CAPA). In addition to process optimization, I have also carried out a RACI assessment in PLD to emphasize the roles and responsibilities.

NEOPLANTS SAS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Dona SLEIMAN

Evolution dirigée de protéines pour améliorer l'esthétique de plantes d'intérieur

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 10h05 - Jury D

Evolution dirigée, ingénierie des protéines, fluorescence, biologie synthétique, pollution, plante, environnement, clonage, purification, protéine recombinante, tri cellulaire

En moyenne, on passe 90% de notre temps à l'intérieur et l'air y est environ 5 fois plus pollué que l'air extérieur. C'est pourquoi la start-up Neoplants utilise les derniers outils de biologie synthétique pour développer la première génération de plantes capables d'assainir l'air intérieur.

Le but de mon stage est d'utiliser l'évolution dirigée de protéines pour améliorer l'esthétique de ces plantes, afin d'obtenir des plantes radicalement différentes de toute autre plante sur Terre. L'objectif était d'optimiser l'activité de protéines fluorescentes pour obtenir une fluorescence dans les feuilles des plantes visible à l'œil nu et sous simple lumière.

J'ai donc généré des banques de mutants de différentes protéines fluorescentes par des techniques de mutagenèse aléatoire dont l'error-prone PCR ou par la souche mutatrice XL1Red. Ensuite, j'ai utilisé le tri cellulaire (FACS) pour sélectionner les protéines évoluées possédant les caractéristiques les plus intéressantes que j'ai exprimé transitoirement chez les plantes par des agroinfiltrations.

De plus, j'ai pu travailler sur un autre projet visant lui aussi à modifier l'esthétique des plantes en réalisant des tests d'expression de protéines chez E. coli et en utilisant la purification de protéines sur automate ÄktaTM.

Enfin, j'ai utilisé le clonage de type Golden-Gate (chez les plantes ou chez E. coli) pour créer toutes les constructions génétiques utilisées lors de ces différents projets.

GIF-SUR-YVETTE • FRANCE

3/29/2021 → 9/29/2021

Directed evolution of proteins to improve the aesthetics of indoor plants

Détruit après soutenance

Directed evolution, protein engineering, fluorescence, synthetic biology, pollution, plant, environment, cloning, purification, recombinant protein, cell sorting

On average, we spend 90% of our time indoors and the air is about 5 times more polluted than the air outside. This is why the start-up Neoplants uses the latest tools of synthetic biology to develop the first generation of plants able to purify the air.

The aim of my internship is to use directed evolution of proteins to improve the aesthetics of these plants, in order to obtain plants radically different from any other plant on Earth. The objective was to optimize the activity of fluorescent proteins to obtain a fluorescence in the leaves of the plants visible by naked eye and under simple light.

I generated mutant libraries of different fluorescent proteins by techniques of random mutagenesis such as error-prone PCR and a mutator strain (XL1-Red). Then, I used cell sorting (FACS) to select the best evolved proteins that I finally expressed transiently in plants by performing agroinfiltrations.

Moreover, I worked on another project aiming at changing the aesthetics of plants by doing protein expression tests in E. coli and using protein purification on ÄktaTM.

Finally, I used Golden-Gate cloning (in plants or in E. coli) to create all the genetic constructs used in these different projects.

Margaux
D'AVOLA

CBI

INRA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Sabine LEROY

Caractérisation des microbiotes de la viande ovine, un point clé pour maîtriser la qualité sanitaire des produits dérivés

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

jeudi 7 octobre - 09h15 - Jury B

Viande ovine, diversité bactérienne, conditionnement, métabarcoding, collection de souches, séquençage de l'ARNr 16S

Depuis le début des années 2000, la consommation de viande ovine diminue en France avec un vieillissement des consommateurs et un prix élevé par rapport à d'autres sources de protéines. De plus, contrairement à d'autres types de viande, la viande ovine n'est pas commercialisée sous forme de produits élaborés tels que les steaks hachés. Afin de développer de nouveaux produits à base de viande ovine, ce projet a pour objectif de caractériser le microbiote d'échantillons de carcasse, de laine et de viande hachée provenant de différents types d'agneaux pour déterminer les critères limitants. De plus, l'impact d'un conditionnement de la viande hachée sous atmosphère modifiée ou sous vide au cours du temps a été évalué. Une approche de métabarcoding et une approche culturale suivie de l'identification de souches ont été réalisées afin d'évaluer au mieux la diversité bactérienne présente. Les résultats de métabarcoding ont mis en évidence une diversité bactérienne importante au niveau des échantillons de carcasse et de laine. Pour les échantillons de viande hachée, le type et la durée de conditionnement impactent fortement la diversité qui diminue au fur et à mesure du processus de conservation. Après 6 jours sous atmosphère modifiée et 12 jours sous vide, les genres *Brochothrix*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pholobaclerium* et *Dellaglioia* sont majoritaires dans les échantillons de viande hachée. L'identification de souches par une approche culturale a quant à elle permis de constituer une collection de souches présentes dans les échantillons de viande hachée et d'identifier d'autres genres appartenant entre autres à l'ordre des Enterobacterales et notamment l'espèce *Hafnia alvei*.

SAINT GENES CHAMPANELLE • FRANCE

3/1/2021 → 8/31/2021

Characterization of lamb meat microbiota, a key point to control the sanitary quality of derived products

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Sheep meat, bacterial diversity, packaging, metabarcoding, strain collection, 16S rRNA sequencing

Since the early 2000s, the consumption of sheep meat has decreased in France with aging consumers and a high price compared to other sources of protein. In addition, unlike other types of meat, sheep meat is not marketed in the form of elaborate products such as ground steaks. In order to develop new sheep meat products, this project aims to characterize the microbiota of carcass, wool and minced meat samples from different types of lambs to determine the limiting criteria. In addition, the impact of packaging minced meat under a modified atmosphere or under vacuum over time was evaluated. A metabarcoding approach and a cultural approach followed by the identification of strains were carried out in order to best assess the bacterial diversity present. The results of metabarcoding revealed significant bacterial diversity in the carcass and wool samples. For minced meat samples, the type and duration of packaging strongly impact the diversity which decreases as the preservation process progresses. After 6 days under modified atmosphere and 12 days under vacuum, the genera *Brochothrix*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Photobaclerium* and *Dellaglioia* are in the majority in the minced meat samples. The identification of strains by a cultural approach permitted to constitute a collection of strains present in the minced meat samples and to identify other genera belonging to the Enterobacterales order among others, in particular the species *Hafnia alvei*.

Fanny
DE CLERCQ
Classique

GLOWEE SAS

Evry Courcouronnes • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Damien GELLIN

10/5/2020 → 10/8/2021

Implémentation d'une filtration stérilisante en ligne sur l'alimentation d'un système continu de culture bactérienne bioluminescente

Implementation of an in line sterile filtration on continuous supply of a bioluminescent fermentation process

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 11h10 - Jury C

Développement, qualification et optimisation de procédés, filtration stérilisante, culture de microorganismes, chemostat, production de bioluminescence

Development, qualification and optimisation process, sterile filtration, fermentation, chemostat, bioluminescence production

Au sein des animaux marins, près de 80% des espèces utilisent la bioluminescence à des fins de reproduction, défense ou communication. Cette lumière, produite par une réaction enzymatique, résulte d'une conversion d'énergie chimique en énergie lumineuse. L'origine de cette lumière peut provenir directement de l'animal mais pour la majorité des espèces, elle naît d'une symbiose avec des microorganismes où se déroule cette réaction. Cultivés en milieu liquide, ces microorganismes forment une lumière vivante. C'est précisément pour cet aspect que la start-up française Glowee a pour ambition d'apporter une alternative à la signalisation et l'éclairage urbain grâce à la bioluminescence. Cette lumière bleue hors du commun permet d'une part de réduire la pollution lumineuse des villes mais également d'adopter de par son aspect liquide n'importe quelle forme. Glowee développe actuellement un prototype d'éclairage urbain, un système qui repose sur un procédé de culture continu permettant de produire de la bioluminescence en permanence. Pour cela, le renouvellement du milieu nutritif est au coeur du contrôle du procédé. La stérilisation des nutriments neufs représente un enjeu majeur pour le développement du prototype car la production durable de bioluminescence nécessite d'exclure toute contamination extérieure du bioréacteur pour conserver la pureté de la culture. Au sein de ce projet ma contribution fut d'implémenter une filtration stérilisante en ligne sur l'alimentation du procédé continu. La première partie du projet fut de déterminer les caractéristiques du filtre afin que celui-ci soit le plus adapté au milieu de culture utilisé et aux débits d'alimentation réglés. Ces caractéristiques regroupent la nature chimique de la membrane, la forme de la membrane et la surface de filtration. D'autres problématiques comme le stockage et la conservation bactériologique du milieu non filtré vinrent s'intégrer au projet et influencer les choix sur les critères du filtre.

Over 80% of marine species use bioluminescence for reproduction, defence or communication. The light results from an enzymatic reaction, during the conversion of chemical energy into luminous energy. The bioluminescence can be directly synthesized by the animal but in most cases it comes from microorganisms living in symbiosis with them. When they are cultivated in a liquid medium, the microorganisms form a living lighting. It is for such a capacity that the French start-up Glowee decided to develop a new way of lighting up cities thanks to bioluminescence. Its blue color, intensity and shape make it atypical, able to reduce city light pollution and take whatever form imaginable. Currently, Glowee is building a city lighting prototype, a system based on a continuous process which can emit bioluminescence permanently. To control this process, the supply in fresh medium is fundamental. To produce bioluminescence continuously, the sterilization of the feed is crucial, it avoids contamination and keeps the culture pure. My contribution within this project was to implement an in line sterile filtration on the supply of the continuous process. The first step was to determine the main characteristics of the filter to make it suitable with the culture media and the flow used. The most important characteristics were the media of the membrane, its shape and the effective filtration area. It was also necessary to measure the impact of the 'filtration on the growth and light production of bacteria. Other challenges were added to the project like the storage and the bacteriological conservation of the media before filtration. All these points had to be taken into account for the choice of the filter.

Romane
DEBUT

CP

SANOFI Chimie - Aramon

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Helder PEREIRA

Maitrise du procédé Rasburicase

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h50 - Jury C

Industrialisation, Purification, Validation, Temps de stockage, Paramètre de suivi.

Alexandre
DELASALLE

Classique

Le groupe Sanofi est un leader mondial dans le domaine de l'industrie pharmaceutique. Fondée en 1973, il est présent de nos jours dans plus de 100 pays et emploie plus de 100 000 collaborateurs. Le groupe se concentre sur cinq secteurs d'activité principaux : Le diabète et les maladies cardiovasculaires, la médecine générale, la santé grand public, les vaccins et la médecine de spécialités. En France, la société est présente dans plus de 10 régions avec 36 sites au total. Mon stage s'est déroulé au sein du site de production d'Aramon dans le département du Gard. Le site possède trois activités de production différentes qui sont la chimie organique, les biotechnologie et l'extraction végétale.

Au sein de l'équipe industrialisation du département de biotechnologies, j'ai pu travailler sur le procédé de production de la Rasburicase. Cette enzyme recombinante de l'urate oxydase, commercialisée sous le nom de Fasturtec® en forme injectable, est administrée aux enfants subissant les effets secondaires de la chimiothérapie. Sa production est réalisée à partir d'une souche de *Saccharomyces Cerevisiae* génétiquement modifiée et fait intervenir 3 grandes étapes de production réalisées sur le site d'Aramon : la fermentation en bioréacteur, l'extraction et la purification avec 8 étapes différentes.

L'objectif de ce stage était de mener une mission d'ingénieur junior, dans une démarche de gestion de projet. J'ai donc pu participer à différents projets, et notamment deux projets qui m'ont été confiés et ayant comme objectif une meilleure maîtrise du procédé Rasburicase. Le premier projet porte sur la validation du temps de stockage du pool après une étape de purification, une chromatographie échangeuse de cations, suite à des dépassements récurrents du temps de stockage initialement validé. Le second a pour but la mise en place d'un nouveau paramètre de suivi sur l'une des étapes d'ultrafiltration et ainsi permettre une meilleure appréhension du vieillissement des membranes d'ultrafiltration.

Aramon • FRANCE

4/12/2021 → 10/1/2021

Control of the Rasburicase process

Détruit après soutenance

Industrialisation, Purification, Validation, Holding time, Monitoring parameter

The Sanofi group is a world leader in the pharmaceutical industry. Founded in 1973, it is present today in more than 100 countries and employs more than 100,000 people. The group focuses on five main business areas: Diabetes and Cardiovascular Diseases, General Medicine, Consumer Health, Vaccines and Specialty Medicine. In France, the company is present in more than 10 regions with 36 sites in total. My internship took place at the Aramon production site in the Gard department. The site has three different production activities which are organic synthesis, biotechnology and vegetal extraction.

Within the industrialization team of the biotechnology department, I was able to work on the production process of Rasburicase. This recombinant enzyme of the urate oxidase is marketed under the name Fasturtec® in an injectable form and is given to children who undergo side effects of chemotherapies. A genetically modified strain of *Saccharomyces Cerevisiae* is used to produce this recombinant enzyme and 3 of its production steps are carried out in Aramon: the fermentation in bioreactor, the extraction, and the purification with 8 different stages.

The objective of this internship was to carry out a junior engineer assignment, in a project management approach. I was therefore able to participate in various projects, including two projects that were entrusted to me with the objective of better controlling the Rasburicase process. The first project concerns the validation of the storage time of the pool after a purification step, a cation exchange chromatography, following recurrent overruns of the storage time initially validated. The second aims to set up a new monitoring parameter on one of the ultrafiltration stages and thus allow a better understanding of the aging of ultrafiltration membranes.

DDS ALLIANCE SA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Daniel DOS SANTOS

Ingénieur(e) Chef de Projet en Biotechnologie Jaune

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

vendredi 8 octobre - 16h05 - Jury D

Gestion de projet, Agroforesterie, Paulownia, Agriculture biologique, Terrain vitrine, Cultures maraîchères et céréalières, Subsidies, Jira

C'est dans le contexte de la crise environnementale actuelle, toujours plus inquiétante, et avec l'envie de créer un modèle circulaire que Daniel Dos Santos a fondé Treesion. Ce projet agroforestier a pour but de produire une quantité importante de biomasse végétale, grâce à un arbre appelé Paulownia, afin d'absorber un maximum de CO2. Il permet également de créer de l'emploi dans les zones rurales grâce à un travail collaboratif avec des agriculteurs. De plus, Treesion offre à chacun la possibilité d'investir sur les arbres plantés grâce à un nouveau modèle d'investissement vert et durable.

J'ai été engagée en tant que stagiaire consultante par la DDS Alliance afin de participer à l'élaboration de la stratégie de développement de cette start-up. J'ai tout d'abord apporté mon aide à la création de la stratégie financière et juridique de Treesion ainsi qu'à sa mise en œuvre. En travaillant de concert avec une équipe d'agronomes et d'agriculteurs, j'ai également élaboré le modèle du premier terrain vitrine qui permettra de démontrer l'efficacité et les avantages de l'agroforesterie avec du Paulownia. Cette parcelle est basée en Belgique, pays au rayonnement européen et qui encourage la création de projets écologiques grâce à de nombreuses subventions. J'ai développé le réseau de Treesion en entrant notamment en contact avec des institutions étatiques comme l'INRAE ou encore la Chambre d'Agriculture de la Haute-Marne. A travers la création d'un catalogue agricole, j'ai perfectionné et précisé le modèle agricole utilisé tout en produisant un support d'information pour les agriculteurs.

Tout au long de ce projet de fin d'études et afin de réaliser ces différentes missions, j'ai utilisé des outils de gestion de projet dont Vaneo et Jira. Ce dernier permet la mise en place d'une méthodologie de travail Agile basée sur l'adaptabilité du projet par rapport à son environnement. J'ai également travaillé en tandem avec les différentes équipes de Treesion tout en développant le réseau de communication interne de l'entreprise à l'aide de supports comme les minutes meeting.

LAUSANNE • SUISSE

3/29/2021 → 9/10/2021

Project Manager Engineer in Yellow Biotechnology

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Project Management, Agroforestry, Paulownia, Organic Farming, Model field, Vegetable and cereal crops, Subsidies, Jira

Daniel Dos Santos founded Treesion in a context of an ever more worrying environmental crisis and with the desire to create a circular model. This agroforestry project aims to produce a large amount of plant biomass, thanks to a tree called Paulownia, in order to absorb as much CO2 as possible. It also allows to create employment in rural areas through collaborative work with farmers. In addition, Treesion offers to everyone the opportunity to invest in the trees planted thanks to a new model of green and sustainable investment.

I was hired as an intern consultant by the DDS Alliance to participate in the elaboration of the development strategy of Treesion. I first assisted in the creation of Treesion's financial and legal strategy and its implementation. Working with a team of agronomists and farmers, I also elaborated the plan of the first model field which will demonstrate the efficiency and benefits of the agroforestry with Paulownias. This plot is based in Belgium, a county with an European influence that encourages the creation of ecological projects thanks to numerous subsidies. I have developed the network of Treesion by contacting state institutions such as INRAE and the "Chambre d'Agriculture de la Haute-Marne". Through the creation of an agricultural catalogue, I perfected and clarified the agricultural model used by Treesion while producing an information support for farmers.

Throughout this final year project and in order to realize these different missions, I used project management tools such as Vaneo and Jira. This one allows the implementation of an Agile work methodology based on the adaptability of the project to its environment. I also worked with the different teams of Treesion while developing the internal communication network of the company with the help of support such as the minutes meeting.

Lili
DURAND-
SALMON

CBI

NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY - MBS DEPARTMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Laurianne VAN LANDEGHEM

Etude du rôle de la protocadhérine-8 dans les cellules souches épithéliales intestinales adultes

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

vendredi 8 octobre - 16h05 - Jury A

Intestinal epithelium, adult intestinal stem cells, protocadherin Pcdh8, culture d'organoïdes

L'épithélium intestinal est le tissu ayant la plus grande capacité d'auto-renouvellement (3-7 jours selon les régions et espèces). Ce renouvellement est réalisé par les cellules souches épithéliales intestinales adultes (CSI) dont la capacité à générer du tissu épithélial digestif fonctionnel représente un potentiel thérapeutique inestimable en médecine régénérative. Pour exploiter ce potentiel, il est nécessaire de définir le rôle des protéines régulatrices clés dans les CSI et des voies de signalisation associées. Des études précédentes ont identifié la protocadhérine 8 (Pcdh8) comme significativement surexprimée dans les CSI par rapport à tous les autres types de cellules épithéliales intestinales. Néanmoins, le rôle de Pcdh8 dans l'épithélium intestinal n'a jamais été étudié.

Mes travaux de stage ont eu pour objectif de déterminer le rôle de Pcdh8 dans les CSI adultes et sont divisés en trois parties : Premièrement nous avons cherché à déterminer la localisation de Pcdh8 dans l'épithélium intestinal par immunofluorescence en utilisant un modèle de souris rapporteur Pcdh8EmGFP. Nous avons également eu pour but d'évaluer la capacité des cellules exprimant Pcdh8 à produire des cellules épithéliales intestinales ex vivo dans des cultures d'organoïdes en 3D. Ensuite, nous avons évalué si l'expression de Pcdh8 est essentielle pour les fonctions des CSI. À l'aide de souris knock-out Pcdh8fl/fl, nous avons étudié l'impact de la délétion de Pcdh8 sur les CSI ex vivo en utilisant la recombinase TAT-Cre dans des cultures d'organoïdes en 3D et in vivo en croisant les souris Pcdh8fl/fl avec la lignée Lgr5-CreERT2. Enfin, nous avons cherché à identifier les partenaires de liaison de Pcdh8 dans l'épithélium intestinal par immunoprécipitation et spectrométrie de masse. Nous avons également voulu définir quel(s) type(s) de cellules épithéliales intestinales expriment les partenaires de liaison identifiés à l'aide de données RNAseq.

Ainsi mes travaux de stage de 3e année ont permis d'améliorer les connaissances sur le rôle de Pcdh8 dans la régulation des fonctions des CSI.

RALEIGH • ETATS-UNIS

4/1/2021 → 10/15/2021

Defining the role of protocadherin-8 in adult intestinal epithelial stem cells

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Intestinal epithelium, adult intestinal stem cells, protocadherin Pcdh8, organoid culture

The intestinal epithelium is one of the tissues with the fastest self-renewal capacity (3-7 days depending on species and regions). This continuous turnover is driven by adult intestinal epithelial stem cells (ISCs). Their ability to generate functional digestive epithelial mass represents a high therapeutic potential in regenerative medicine. To harness ISC potential, it is necessary to identify and define the role of key regulatory proteins and associated molecular pathways controlling ISC functions. Unpublished work has identified protocadherin 8 (Pcdh8) as significantly overexpressed in ISCs versus all other intestinal epithelial cell types, suggesting that Pcdh8 is a marker of ISCs. Pcdh8 is a transmembrane adhesion protein that belongs to the cadherin superfamily. While a majority of protocadherins are predominantly expressed in the central nervous system where they regulate the establishment and functioning of neural circuits, the role of Pcdh8 in the intestinal epithelium has never been studied.

My Master's thesis aims to investigate the role of Pcdh8 in adult ISCs and is divided in three main chapters: First, using a Pcdh8-EmGFP-CreERT2 knock-in mouse model, we aimed to determine the localization of Pcdh8 in the intestinal epithelium using immunofluorescence. We also aimed to assess Pcdh8-expressing cell ability to produce intestinal epithelial cells ex vivo in 3D single cell organoid cultures. Next, we aimed to assess whether Pcdh8 expression is essential for the maintenance of ISC function. Using Pcdh8fl/fl knock-out mice, we investigated the impact of Pcdh8 deletion on ISC function ex vivo by using TAT-Cre recombinase in 3D crypt organoid cultures and in vivo by crossing Pcdh8fl/fl mice with the Lgr5-CreERT2 line. Finally, we aimed to identify Pcdh8's binding partners in the intestinal epithelium using immunoprecipitation coupled with mass spectrometry analyses. We also aimed to define which intestinal epithelial cell type(s) express the identified binding partners using available RNAseq data.

Myliène
EGENSPERGER

Classique

GENZYME POLYCLONALS SAS

LYON • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Christine BENDAHOU

3/15/2021 → 9/10/2021

Développement d'une méthode analytique mesurant la cytotoxicité des IgG sur des cellules mononuclées (CMN) humaines en présence de complément humain par cytométrie en flux

Development of an analytical method which measure the IgG cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with human complement by flow cytometry

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 09h15 - Jury A

Développement de méthode analytique, immunologie, cytométrie en flux, lyse dépendante du complément, anticorps

Analytical method development, immunology, flow cytometry, complement-dependent cytotoxicity, antibodies

Lorsqu'un patient reçoit une greffe, l'organe est reconnu par l'organisme comme « non soi » ce qui déclenche une réponse immunitaire. En particulier, les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules du greffon, conduisant ainsi à un rejet de greffe. Une solution pour éviter ce rejet est de dépléter de façon transitoire les lymphocytes du patient afin d'empêcher cette attaque. Sanofi Genzyme produit un immunosuppresseur composé d'anticorps anti-lymphocytaires qui empêchent ou réduisent la réponse immunitaire et préviennent donc le rejet de greffe.

When a patient receives a transplant, the organ is recognized by the immune system as "unknown". Then the patient's effector T-cell destroy the transplant cells, thus leading to graft rejection. Transitory depletion of the lymphocytes allows preventing this attack. Sanofi Genzyme produce an immunosuppressive drug composed by anti-lymphocytic antibodies which reduces the cellular immune response and therefore prevent transplant rejection.

L'objectif de mon stage est de développer une méthode analytique mesurant par cytométrie en flux la cytotoxicité du produit de Sanofi Genzyme sur des cellules mononuclées humaines en présence de complément humain. Le but de la méthode est de mesurer, pour chaque point d'une gamme de concentration du produit à tester, le pourcentage de lyse cellulaire sur une suspension de cellules mononuclées de sang périphérique humain, en présence de complément humain. Le résultat est exprimé sous forme d'un EC50 (concentration efficace médiane) représentant la concentration en produit induisant 50% de lyse. A l'issue du développement, les conditions opératoires ont été déterminées. Enfin, la robustesse a été démontrée en faisant légèrement varier certains paramètres afin de déterminer si la réponse est variable et donc si la méthode est robuste. Puis, une évaluation de la performance de la méthode a été réalisée. La méthode a ensuite été utilisée pour caractériser le produit issu de deux procédés de purification différents.

The objective of my internship is to develop a flow cytometry method measuring the product cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), mediated by human complement. The aim of the method is to measure, on a range of concentration of Thymoglobulin tested on a suspension of human mononuclear cells, the percentage of cell lysis, in presence of human complement. Result is given as a EC50 (half maximal effective concentration), representing the product concentration to reach 50% of lysis. To develop this method, the operating conditions have been determined. Then, the robustness has been demonstrated, some parameters have slightly varied in order to determine if the response is variable and therefore if the method is robust. Finally, the method performance has been evaluated. Then the method was used to characterize products issued from two different purification processes.

Alexandrine
FAIVRE

Classique

NOVOPTIM

Paris • FRANCE

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

10/1/2020 → 10/8/2021

Marketing stratégiques pour entreprises innovantes et accompagnement d'une société de biotechnologie française pour la mise en place d'une nouvelle offre.

Strategic marketing support on Business Development projects for biotech companies wishing to develop their market in Europe. Strategic marketing support on Business Development projects for biotech companies wishing to develop their market in Europe.

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance non confidentielle

jeudi 7 octobre - 11h10 - Jury B

Marketing stratégique – Business Development – Innovation- Conseil –
Biotechnologies – Étude de marché

Strategic marketing – Business Development – Innovation - Consulting –
Biotechnology – Market research

Maëlle
FERRIER

CP

Novoptim est une société française de conseil aux entreprises qui aide les sociétés biotechnologiques du monde entier à accélérer l'accès au marché européen de leurs produits ou services. Novoptim offre une large gamme de services, se focalisant principalement sur de l'étude de marché, très précoce, au développement commercial. Les projets menés au sein du cabinet diffèrent selon les besoins des entreprises clientes et selon la maturité de ces sociétés ou de leur projet. La variété des projets menés en parallèle, m'ont ainsi permis de couvrir multiples aspects du métier de consultant en marketing stratégique mais aussi de gagner en compétences et en connaissance tout au long de mon année d'alternance. J'ai pu contribuer à plus de 6 projets différents dont des études de marchés, des projets de Business Development, ainsi qu'un projet moins commun de prospection d'entreprise pour le compte d'un grand cluster d'entreprises de biotechnologies française. Parmi ces projets, j'ai eu l'opportunité de réaliser de prendre part à toutes les étapes d'une étude de marché pour une entreprise française souhaitant développer une nouvelle offre de test in vitro d'efficacité et toxicité. Dans le cadre de cette étude, l'objectif était d'identifier des potentiels utilisateurs de cette offre, sonder ce marché sur la plus-value de l'offre et proposer des recommandations sur le développement de cette offre inédite, du business model au plan stratégique pour la mise sur le marché. L'atteinte de ces objectifs reposait sur plusieurs critères telles que l'étude de l'état du marché, la veille concurrentielle ainsi que la réalisation et l'analyse d'interviews d'utilisateurs potentiels.

Novoptim is a French business consulting company providing services to biotech companies from all over the world to accelerate the access to the European market for their products or services.

Novoptim offers a wide range of services, mainly focusing on early market research and late business development. The projects led within the firm differ according to the needs of the clients and the maturity of these companies or their projects. During my year of work, the different projects carried out at the same time have allowed me not only to discover multiple aspects of the strategic marketing consultant's job but also to gain a lot of various and important skills and knowledge. I contributed to more than 6 different projects including market studies, business development projects as well as a project of client prospection a French bio-cluster targeting innovative companies in bioproduction and bioeconomy. Among these projects, I had the opportunity to be involved at all steps of a market study for a French company aiming to develop a new in vitro efficacy and toxicity test offer. Within the framework of this study, the objectives were to identify potential users of this offer, to probe this market on the added value of the offer and to suggest recommendations on the development of this new offer, from the business model to the strategic plan for the market launch. The achievement of these objectives was based on several criteria such as the study of the state of the market, competitive intelligence or even the analysis of user interviews.

SANOFI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Cinthia TECHER

Amélioration de la maîtrise de la température des procédés de fabrication de valences vaccinales virales et bactériennes.

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 09h15 - Jury B

MARCY L'ETOILE • FRANCE

8/31/2020 → 10/8/2021

Improvement of temperature management for bacterial and viral vaccine antigen manufacturing processes.

Détruit après soutenance

Loïc
FORESTIER

CP

Les vaccins sont des outils essentiels, qui ont une place primordiale dans les stratégies de santé publique au travers le monde. Leur fabrication industrielle implique la réalisation d'un nombre important d'étapes, sur des périodes pouvant s'étendre jusqu'à 18 mois. Une de ces étapes est la production « vrac », où les valences sont proprement produites.

Sur le site Sanofi Pasteur de Marcy-l'Étoile, deux types procédés sont utilisés : la fermentation de pathogènes bactériens et la culture virale sur cellules de mammifères.

La fabrication du vrac implique une régulation fine de la température pour la conduite de certaines étapes de procédé et pour le stockage des intermédiaires de production ou des nombreuses matières premières utilisées.

Dans une perspective d'amélioration continue, Sanofi Pasteur a décidé d'entreprendre une étude de la maîtrise de la température dans ses enceintes thermostatées, via une méthodologie d'analyse de risque. Cela a permis d'identifier des actions d'amélioration, et de déterminer le risque pour les produits, en cas d'écart lors de l'utilisation des équipements thermorégulés. Ces actions ont permis d'augmenter le niveau de qualité des vaccins produits, au bénéfice des plus de 500 millions de patients à qui un vaccin Sanofi Pasteur est administré chaque année.

Vaccines are essential tools that have an all-important role in every public health strategy across the world. Their industrial manufacturing consists of numerous steps, that can last up to 18 months from start to finish. One of those steps is called « bulk » manufacturing, where antigens are made. At Sanofi Pasteur's site in Marcy-l'Etoile, two types of processes are used: pathogenic bacteria fermentation and viral culture on mammal cells.

Bulk manufacturing involves precise regulation of the temperature for some process steps and for the storage of intermediates and the numerous raw materials used.

In a continuous improvement perspective, Sanofi Pasteur decided to perform a study about the control of its temperature-controlled chambers, through a risk analysis-based approach. It enabled to identify improvement opportunities, and to evaluate the risk for the product, in case of a temperature excursion during the use of the various equipment. Those actions allowed to improve the quality level of the vaccines manufactured, to the benefit of more than 500 million patients that receive a vaccine from Sanofi Pasteur each year.

NOVOPTIM SARL

Paris • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Vincent CRAVE

3/1/2021 → 8/15/2021

Accompagnement de la nouvelle business unit d'une entreprise américaine dans son expansion en Europe

Supporting the new business unit of an American company in its expansion in Europe

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance non confidentielle

jeudi 7 octobre - 16h55 - Jury B

Marketing Opérationnel Business development - Biotechnologies Conseil Cellules et tissus primaires humaines In-vitro testing Toxicologie - DMPK

Operational Marketing - Business development - Biotechnology - Consulting Primary human cells and tissues In-vitro testing Toxicology - DMPK

Mathilde
GAILLAC

Classique

Implantée à Paris, France, Novoptim est un cabinet de conseil en stratégie marketing et de développement commercial pour des entreprises de biotechnologies américaines et européennes souhaitant développer leurs produits ou services sur le marché européen. En fonction des besoins des entreprises, les missions menées par le cabinet part d'une étude de marché de plusieurs semaines des projets de business développement pouvant durer plusieurs années. Ces projets conduits en parallèle, m'ont permis de découvrir divers aspects du métier de consultant marketing au cours de ces 6 mois de stage. J'ai ainsi été amenée à suivre le déroulement 3 projets internes à l'entreprise et de 2 projets clients, dont une étude de LeadID et un projet de business développement. Parmi ceux-ci, j'ai eu l'opportunité de contribuer à l'expansion d'une entreprise américaine en Europe. Cette société américaine est une Organ Procurement Organization (OPO) qui a développé il y a 2 ans une branche spécialisée dans l'approvisionnement de cellules et de tissus primaires humains. Dans le cadre de ce projet de business development, l'objectif était de définir une stratégie marketing et un plan d'action ainsi que de le suivre afin de conquérir le marché européen. L'atteinte de ces objectifs reposait sur plusieurs activités telles que la mise en place de campagnes d'emailing, la participation à des conférences ou encore l'organisation de webinaires.

Novoptim is a business consulting company specialized in early market development for innovative technologies in the European Life Science and Healthcare markets. With 15 years of experience, Novoptim has developed an extensive network and a proprietary methodology to fast-track market access in Europe, grow companies' top line and ramp up commercialization. Novoptim performs Market Studies for tech companies to define their go-to-market strategy and manages European market entry with a step-by-step Strategic Action Plan executed by its experienced marketing and sales outsourcing resources. The projects carried out within the firm vary from market studies lasting a few weeks to business development projects over several years, depending on the needs of the companies. Several projects are carried out in parallel, allowing me to discover different aspects of the marketing strategy consulting profession during this 6-month internship. I have been involved in the progress of 2 different projects, including 1 LeadID and 1 business development projects. Among these, I had the opportunity to contribute to the expansion of an American company in Europe. This American company is an Organ Procurement Organization (OPO) which developed 2 years ago a branch specialized in the sourcing of human primary cells and tissues. The objective of this business development project was to define a marketing strategy and an action plan to conquer the European market. The achievement of these objectives was based on several activities such as the implementation of emailing campaigns, the participation in conferences and the organization of webinars.

ROCHE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Raphaëlle GOBET

Alternante Compliance Process Training System (CPTS)

Rapport confidentiel
Soutenance non confidentielle

vendredi 8 octobre - 14h00 - Jury B

Recherche Clinique, Qualité, Amélioration continue, Système de management de la qualité, Conseil et formation

Le développement d'un médicament réalisé par des laboratoires pharmaceutiques, avant son utilisation par des personnes malades (validée par une Autorisation de Mise sur le Marché - AMM), est un processus complexe et réglementé internationalement et dans chaque pays où il se conduit. Ce développement, pouvant durer plusieurs dizaines d'années, se déroule en plusieurs étapes avec :

- des recherches fondamentales pour identifier des molécules cibles qui subissent ensuite des tests pharmacologiques/toxicologiques pour identifier leurs propriétés / métabolisme / toxicité / dose potentielle
- des recherches sur l'Homme, appelées en France RIPH (Recherche Impliquant la Personne Humaine). Ces recherches (appelées essais cliniques), permettent de déterminer la dose optimale (posologie, rythme, durée), l'efficacité, la tolérance, les effets indésirables et les bénéfices et risques par rapport à un traitement de référence pour la pathologie concernée.

J'ai réalisé mon alternance au sein de l'équipe Compliance Process Training System (CPTS) du département des Opérations Cliniques (OC) de la filiale France du Laboratoire Roche. Cette équipe, positionnée de façon transverse dans la conduite des essais cliniques, accompagne les collaborateurs des OC, dans la maîtrise et le respect des standards internes (procédures Roche) et externes (aspects législatifs et réglementaires en vigueur, guidelines internationales - ICH GCP...) environnant la conduite des essais cliniques. Au cours de cette année, j'ai réalisé des activités de compliance (contrôle qualité, revue documentaire de procédures/documents de gestion des essais, gestion et résolution de nonconformités/déviations, mise en place et suivi d'actions correctives et préventives - CAPA). Dans le cadre de l'amélioration continue du Système de Management de la Qualité de Roche, j'ai effectué la mise à jour de procédures et contribué au déploiement de la stratégie compliance locale en participant notamment à la formation des collaborateurs.

BOULOGNE-BILLANCOURT • FRANCE

10/1/2020 → 10/8/2021

Compliance Process Training System (CPTS) Intern

Détruit après soutenance

Clinical Research, Quality, Continuous improvement culture, Quality management system, Team training and support

Drug development carried out by pharmaceutical laboratories, before its use by ill people (validated by a Marketing Authorization), is a complex process, regulated internationally and in each country where it is carried out. This development, which can last for several decades, involves several stages:

- fundamental research to identify target molecules which then undergo pharmacological / toxicological tests to identify their properties / metabolism / toxicity / potential dose
- research on humans, called in France 'Research Involving the Human Person' (RIHP). This research, or commonly called clinical trials, makes it possible to determine the optimal dose (dosage, rate, and duration), efficacy, tolerance, side effects and the benefits and risks compared to the standard treatment for the pathology concerned.

I completed my work-study program within the Compliance Process Training System (CPTS) team of the Clinical Operations (CO) department of the France subsidiary of the Roche Laboratory. This team, transversally positioned in the conduct of clinical trials, supports CO employees in mastering and complying with internal (Roche procedures) and external standards (legislative and regulatory aspects in force, international guidelines - ICH GCP, etc.) surrounding the conduct of clinical trials. During this year, I carried out compliance activities (quality control, documentary review of management procedures / documents, management and resolution of non-conformities / deviations, implementation and monitoring of corrective and preventive actions - CAPA). As part of the continuous improvement of Roche's Quality Management System, I updated procedures and I have contributed the deployment of the local compliance strategy by participating in particular in the training of employees.

Lucie
GARTISER
CP

CENTRE SCIENTIFIQUE DE MONACO

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Vincent PICCO

La maintenance anormale du gène EOMES et d'autres facteurs de transcription embryonnaire comme oncogènes atypiques dans le médulloblastome.

Rapport confidentiel
Soutenance non confidentielle

jeudi 7 octobre - 10h05 - Jury A

Cancérologie, génétique, culture cellulaire, biologie moléculaire classique, recherche fondamentale

Les médulloblastomes (MB) sont des tumeurs pédiatriques malignes intra-craniales représentant 20 à 25% des cancers cérébraux de l'enfant. Bien que le MB touche le cervelet, l'initiation de cette tumeur fait débat depuis longtemps. Les sous-classifications moléculaires et le séquençage de masse ont montré que contrairement aux tumeurs chez l'adulte, aucune mutation spécifique menant à la formation de MB n'existe. Ces observations suggèrent que les mécanismes d'initiation et de progression de ces tumeurs sont différents.

Au cours de la dernière décennie, le rôle des progéniteurs neuronaux et des cellules souches comme principaux acteurs de l'initiation et de la progression tumorale a été mis en évidence. Les classifications moléculaires récentes ont renforcé ce paradigme. Comme le développement cérébral intervient à travers la différenciation des progéniteurs, un contrôle strict des cellules souches est nécessaire pour assurer l'homéostasie des tissus. Notre hypothèse stipule que l'initiation des MB résulte d'un mécanisme favorisant un déséquilibre progéniteurs/cellules souches durant le développement cérébral.

Au cours de mon stage, j'ai ainsi étudié le rôle de facteurs de transcription contrôlant les processus de différenciation neuronaux, dans l'initiation et la progression des MB. J'ai concentré mon travail sur le gène EOMES, exprimé au début de la neurogenèse et surexprimé dans de nombreux cas de MB. Grâce à son expression ectopique, j'ai analysé son impact sur la progression au travers d'expériences d'invasion, de prolifération et de croissance tumorale. En parallèle le rôle d'EOMES dans l'initiation tumorale et l'homéostasie tissulaire a été analysé grâce à des expériences de différenciation et de dédifférenciation de cellules neuronales. Cette étude a souligné le rôle d'EOMES dans la différenciation cellulaire, renforçant l'hypothèse que ce gène joue un rôle clé dans l'initiation des MB plutôt que dans leur progression.

MONACO • MONACO

3/8/2021 → 9/10/2021

Aberrant maintenance of EOMES and other embryonic transcription factors genes as atypical oncogenes in medulloblastomas.

Détruit après soutenance

Cancérologie, génétique, culture cellulaire, biologie moléculaire classique, recherche fondamentale

Medulloblastoma (MB) is an aggressively growing pediatric intra-cranial malignancy accounting for 20-25% of all childhood brain tumor. MB originates in the cerebellum. How this tumor arises has been subject of debate for many years. The advent of molecular subtyping and deep genome sequencing showed that, as opposite to adult cancer, clear genetic driver mutations could not account for MB genesis. These observations raise the possibility that the mechanisms of initiation and progression are different.

During the past decade, the role of stem cells as principal contributor of cancer initiation and progression has been highlighted. Recent molecular classifications have reinforced this paradigm. Since brain development occurs through differentiation of progenitor cells, a strict control of stem cell pool is required to assure tissue homeostasis. Our hypothesis is that the initiation of MB results from mechanisms that promote aberrant balance of progenitor/stem cells during brain development.

During my internship, I investigated the role of transcriptional factors driving neurogenic networks as a key regulator of this process and their role as a driver of MB initiation and progression. I focused on EOMES, a gene expressed during the early stage of neurogenesis and overexpressed in numerous cases of MB. By ectopic expression of EOMES, I analyzed its impact on tumor progression through evaluation of invasion, proliferation, and tumor growth. In parallel, I addressed whether EOMES plays a role in tumor initiation. Through differentiation and de-differentiation experiments in neuronal cells, I evaluated the role of EOMES in stem cell homeostasis. This study highlights the role of EOMES in neuronal stem cell differentiation, strengthening the hypothesis that this gene may play a key role during initiation of tumorigenesis rather than progression.

Cecilia
GEORGES
Classique

GENZYME POLYCLONALS SAS

LYON • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Delphine MARTIANO

3/29/2021 → 9/24/2021

Optimisation de méthode analytique en biologie

Optimization of a flow cytometry analytical method used for the quality control of Thymoglobulin®

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 09h15 - Jury A

Développement de méthode analytique, immunologie, cytométrie en flux, anticorps, test d'activité

Analytical development method, immunology, flow cytometry, antibody, activity test

Romane
GOHIER

CBI

L'entreprise Sanofi Genzyme basée à Lyon est le site de production du médicament Thymoglobuline®, un immunosuppresseur constitué d'anticorps polyclonaux dirigés contre les lymphocytes T cytotoxiques humains. Il est indiqué en cas de greffe d'organes solides ou de moelle osseuse afin d'éviter que le système immunitaire du patient ne s'attaque au greffon. Sanofi accompagne chaque année près de 50 000 patients dans le monde grâce à ce traitement anti-rejet issu de la bioproduction. Avant d'être libéré sur le marché, chaque lot de ce médicament est évalué par le département de contrôle qualité afin de vérifier la conformité de son activité. Les méthodes analytiques permettant d'attester de cette conformité sont développées par le service de support technique et analytique de l'entreprise dans lequel j'ai réalisé mon stage. Suite à un changement d'équipement de cytométrie en flux, il est nécessaire de réaliser des études d'équivalence ou d'optimiser certaines méthodes. L'objectif de mon projet de fin d'études a été de travailler sur le transfert de méthode d'un de ces tests libérateurs de lot, sur les nouveaux appareils de cytométrie.

The site of Sanofi Genzyme located in Lyon manufactures Thymoglobulin®, an immunosuppressive drug composed of polyclonal antibodies directed against human cytotoxic T-lymphocytes. This drug is recommended for patients undergoing transplants of solid organs or bone marrow, in order to prevent the immune system from attacking the graft. Thanks to this preventive biotreatment, Sanofi helps about 50 000 patients globally each year. Before being released to the market, every batch needs to be evaluated by the Quality Control department to ensure the conformity of its biological activity. The analytical methods used to attest this conformity are developed by the Analytical and Technical Support team in which I did my internship. After a change of flow cytometry equipment, it is necessary to carry out equivalence studies or optimize some methods. The aim of my project has been to work on the transfer of one of this batch liberating test onto the new flow cytometry devices

LIGHT-CHAIN BIOSCIENCE - NOVIMMUNE SA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Bruno DAUBEUF

Generation of anti-idiotypic monoclonal antibodies for immunoassay development.

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

vendredi 8 octobre - 11h10 - Jury C

Anticorps bispécifiques ; anticorps monoclonaux anti-idiotypes ; technologie des hybridomes ; phases pré-cliniques et cliniques

L'entreprise Light Chain Bioscience est spécialisée dans la découverte et le développement d'anticorps multi-spécifiques préservant la séquence et la structure des anticorps humains pour des applications thérapeutiques, principalement le traitement de cancers.

Pour réaliser les études in vivo pré-cliniques et cliniques de ces anticorps appelés 'bodies', l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-idiotypes est indispensable pour lier et détecter spécifiquement le médicament thérapeutique dans le mélange d'immunoglobulines présent dans le sérum des sujets traités. Ces outils sensibles sont nécessaires pour réaliser des suivis de concentration d'anticorps bispécifiques in vivo au fil du temps et sont essentiels pour caractériser les profils pharmacocinétiques de ces 'bodies'.

L'objectif de mon projet était donc de générer des anticorps monoclonaux anti-idiotypes dirigés contre plusieurs 'KR bodies' en phase pré-clinique en utilisant la technologie des hybridomes. Le but était de constituer un panel de candidats ayant des caractéristiques bien particulières en termes de spécificité et d'affinité mais également de compatibilité avec le développement de futurs essais immunologiques permettant de faire avancer les projets tout au long des phases pré-cliniques et cliniques.

PLAN LES QUATES • SUISSE

3/1/2021 → 8/31/2021

Generation of anti-idiotypic monoclonal antibodies for immunoassay development.

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Bispecific antibodies; anti-idiotypic monoclonal antibodies; hybridoma technology; clinical phases

Light Chain Bioscience is specialized in the discovery and development of multispecific antibodies preserving the sequence and the structure of human antibodies for therapeutic applications, mainly for cancer treatment.

To perform in vivo pre-clinical and clinical studies with these bispecific antibodies called 'KR bodies', anti-idiotypic monoclonal antibodies are critically needed tools to specifically bind and detect the therapeutic drug in the mix of immunoglobulins present in sera of treated subjects. These sensitive reagents are critical for monitoring bispecific antibody concentration over time in vivo to characterize the pharmacokinetic profiles of the 'KR bodies'. The objective of my project was therefore to generate anti-idiotypic monoclonal antibodies against several 'KR bodies' in pre-clinical phase using the hybridoma technology. The aim was to obtain a panel of candidates with desired specificity and affinity suitable for the development of future immunoassays allowing to develop the projects throughout the pre-clinical and clinical phases.

Théo
GRILLOT
Classique

SOLMEYEA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Dimitra KARAGEORGOU

Microalgues pour l'alimentation : du concept à l'échelle pilote.

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

jeudi 7 octobre - 10h05 - Jury B

Microalgues, tubular photobioreacteur, colonne photobioreacteur, autotrophie, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, contamination

Les microalgues sont des micro-organismes autotrophes unicellulaires qui attirent beaucoup d'attention ces derniers temps sur le marché alimentaire pour leur riche profil nutritionnel, incluant protéines, lipides, glucides, antioxydants, vitamines et minéraux. Leur culture offre la possibilité d'utiliser des terres non arables, des eaux usées et du CO2 atmosphérique tout en réduisant l'utilisation d'eau, d'engrais et de pesticides par rapport aux cultures traditionnelles, ce qui en fait une alternative durable à l'agriculture actuelle. Solmeya, une start-up agro-biotechnologique est spécialisée dans la production de biomasse de microalgues de haute qualité et de produits dérivés servant d'ingrédients pour l'industrie alimentaire. En partant des banques de cellules souches jusqu'à l'échelle pilote du photobioréacteur tubulaire de 1000 L, les défis et l'optimisation de la culture des microalgues sont examinés et discutés. La mise en place d'un laboratoire interne est également décrite. *Chlorella vulgaris* et *Haematococcus pluvialis* ont été choisies pour leurs applications commerciales, la première étant approuvée par la FDA pour la biomasse entière et la seconde pour l'astaxanthine, un extrait naturel riche en antioxydants. La maintenance des stocks de cellules axéniques a été conçue suivant un protocole hebdomadaire pour un faible risque de perte de souche. La mise à l'échelle vers un photobioréacteur à colonne de 50 L a été réalisée grâce à des cultures en bouteille Duran peu coûteuses et axéniques. Une étape critique de mise à l'échelle a été identifiée à 50L en raison d'une contamination par des protozoaires inhibant la croissance des microalgues. Les solutions proposées incluent un protocole de nettoyage plus strict, un protocole de démarrage de décontamination in-situ et un traitement chimique appliqué lors de la culture. Le développement d'un procédé downstream suivant une approche en cascade pour l'extraction d'un extrait riche en protéines et d'un extrait riche en lipides est également décrit. Enfin, des scénarios futurs de mise à l'échelle sont présentés.

ATHENS • GRECE

3/8/2021 → 8/27/2021

Microalgae for food : from concept to pilot scale.

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Microalgae, tubular photobioreactor, column photobioreactor, autotrophy, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, contamination

Microalgae are unicellular autotrophic microorganisms drawing a lot of attention lately on the food market for their rich nutrient profile including proteins, lipids, carbohydrates, antioxidants, vitamins and minerals. Their cultivation offers possibility to use non-arable lands, wastewaters, and atmospheric CO2 while reducing the use of water, fertilizers and pesticides compared to traditional crops, making them a sustainable alternative to the current agriculture. Solmeya, an Agri-BioTech Start-up focusing on production of high-quality microalgae biomass and derived-products serving as ingredients for the food industry. From stock-cell banks to 1000 L tubular photobioreactor pilot scale, challenges and further optimization of microalgae cultivation are examined and discussed. Set-up of an in-house laboratory is also described. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* have been chosen for their commercial applications, the first one being FDA approved for whole biomass and the second one for astaxanthin, a natural antioxidant, rich extract. Maintenance of axenic cell stocks has been designed as a weekly protocol for low risk of strain loss. Scaleup to a 50L column photobioreactor was performed through simple, low cost and axenic Duran bottle cultures. A critical scale-up step has been identified at 50L due to a protozoa contamination inhibiting microalgae growth. Proposed solutions include a stricter cleaning protocol, an in-situ decontamination starting protocol and a chemical treatment applied during cultivation. Development of a downstream process following a cascade approach for the extraction of a protein-rich extract and a lipid-rich extract is also described. Finally, future scale-up scenarios are presented.

Diego
GRUMBACH
Classique

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Johannes GEISELMANN

Etude de l'allocation des ressources bactériennes par la construction et la validation de souches de *E. coli* fluorescentes.

Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle

jeudi 7 octobre - 09h15 - Jury D

Microbiologie / Métabolisme / Biologie moléculaire / Recombinaison homologue / Protéine de fusion / Marquage fluorescent / Microfluidique

Le métabolisme d'une bactérie constitue l'ensemble des réactions internes à la cellule qui lui permettent notamment de survivre, croître et évoluer dans son environnement. Celui-ci est très complexe et donc souvent difficile à étudier. Le premier à avoir établi des lois fondamentales sur la croissance bactérienne est Jacques Monod en 1949. Depuis, de nombreuses autres ont été découvertes. Cependant ces études reposent sur des conditions expérimentales bien définies où les microorganismes sont en état stationnaire et donc dans un milieu stable. Or, dans leur état naturel les bactéries ne disposent pas des ressources essentielles de manière continue et sont exposés à la compétition ce qui les force à constamment s'adapter pour pouvoir survivre. On peut alors se demander si les résultats des expériences menés au laboratoire reflètent réellement le comportement de ces organismes. C'est dans ce contexte qu'il a été décidé d'étudier le métabolisme de *E. coli* dans un environnement dynamique, en s'intéressant plus particulièrement à la répartition des ressources lors de la transition entre deux régimes de croissance. Pour cela, deux gènes ont été étiquetés grâce à des protéines fluorescentes. Le premier est *rpsB*, qui code pour une partie du ribosome et qui rend compte du taux d'expression génétique et est fortement corrélé avec le taux de croissance. Le second est *mdh*, il est impliqué dans le cycle de Krebs et permet de suivre le métabolisme énergétique. La façon dont les nutriments sont alloués aux différentes fonctions cellulaires en milieu dynamique est ensuite déterminée par un suivi de la fluorescence sur des cellules uniques en faisant varier la source de carbone au cours du temps.

GRENOBLE • FRANCE

3/22/2021 → 9/24/2021

Study of bacterial resources allocations by the construction and validation of a fluorescent *E. coli* strain.

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Microbiologie / Métabolisme / Biologie moléculaire / Recombinaison homologue / Protéine de fusion / Marquage fluorescent / Microfluidique

Bacterial metabolism represents the entire collection of chemical processes that occur inside the cell and allow the survival and growth of the cell as well as their adaptation to a changing environment. Metabolism is a complex mechanism and therefore difficult to study as a whole. The first to have established fundamental growth laws was Jacques Monod in 1949. Since his pioneering studies, many refinements of the growth laws have been discovered. However, the vast majority of these studies rely on well-defined experimental conditions where microorganisms are in steady state, i.e., in a stable medium composition. In nature, such conditions yet rarely encountered; the availability of essential resources changes over time and bacteria are facing competition. To survive, they have to adapt quickly. We can then ask ourselves if experimental data obtained in the laboratory are really representative of the performance of these organisms.

It is in this context that we decided to study *E. coli* metabolism in dynamic environments, focusing on resources allocation. To this end, two genes have been tagged with different fluorescent proteins. The first is *rpsB*, which codes for a ribosomal protein and allows to follow the activity of the gene expression machinery. The second is *mdh*. The product of this gene is involved in the citric acid cycle and gives us a representation of energy metabolism. The allocation of nutrients in a changing environment is then studied by a single cell analysis measuring fluorescence intensity over time while carrying nutrient upshifts or downshifts.

Tristan
GUILLAUMIN

CBI

SANOPI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Didier CLENET

Développement d'une formulation d'un vaccin lyophilisé et analyse de données à l'aide de logiciels d'intelligence artificielle

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 14h00 - Jury C

Virus vivant atténué, stabilité du vaccin, criblage d'excipients, lyophilisation, modélisation

La stabilité du vaccin est un facteur critique pour assurer la réussite d'un programme vaccinal. En raison de la nature thermosensible des vaccins à base de virus vivants atténués, des formulations spécifiques doivent être développées pour maintenir l'efficacité du vaccin. Les vaccins lyophilisés présentent l'avantage d'être plus stables que des vaccins sous formes liquides. Par ailleurs, en termes de biosécurité et d'échelle de production, l'utilisation de virus atténués cultivés sur cellules est plus avantageuse que celle de virus cultivés sur oeufs. L'objectif de ce stage est de mettre au point une formulation de Phase III sous forme lyophilisée unidose et multidose en utilisant un virus vivant atténué cultivé sur cellules Vero pour remplacer un vaccin historique déjà sur le marché. Le travail effectué est basé sur les formulations préalablement définies de Phase I et de Phase II. La perte de titre infectieux des virus dans la formulation, la miscibilité des excipients, les critères physico-chimiques requis pour des formes injectables (osmolalité, pH, absence de particules visibles, excipients compatibles avec une voie d'administration parentérale), les exigences de production industriels (un cycle de lyophilisation de moins de 24 heures avec des températures de collapse et de transitions vitreuses élevées, l'absence de mousse excessive durant le procédé), l'absence de réactogénicité lors des tests in vivo et les critères d'apparence acceptables du lyophilisat avant et après reconstitution sont les critères cibles les plus importants à prendre en compte pour le développement de cette formulation. Le travail effectué durant ce stage comporte deux volets principaux : le criblage des excipients et l'évaluation de deux logiciels d'intelligence artificielle, nommés C et M. Parmi les meilleures formulations candidates, celles nommées Lead, Backup1 et Backup2 ont été étudiées plus en détails. Au regard des différents critères de sélection, la formulation Backup2 présente un avantage, notamment en termes de miscibilité des excipients à basse température et de la stabilité du virus sous forme lyophilisée. D'autre part, une première évaluation de deux logiciels montrent que les algorithmes d'intelligence artificielle sont applicables pour le choix des formulations avec un avantage pour le logiciel C qui a présenté dans nos conditions les meilleures prédictions.

MARCY L'ÉTOILE • FRANCE

3/1/2021 → 8/27/2021

Development of a vaccine formulation under freeze-dried form and evaluation of artificial intelligence software

Détruit après soutenance

Live-attenuated virus, vaccine stability, screening of excipients, lyophilisation, data modelling

The stability of the vaccine is a key factor ensuring the success of a vaccination program. Due to the thermo-sensitivity of live-attenuated virus-based vaccines, specific formulations must be developed in order to maintain their efficacy. Freeze-dried vaccines have the advantage of being more stable than liquid forms.

The aim of the internship is to develop uni- and multi-dose lyophilised forms of a phase III formulation of a live attenuated virus grown on Vero cells as part of the lifecycle management of the historical vaccines produced on eggs currently on the market.

The work carried out during this internship was based on the previously defined Phase I and Phase II formulations. The conservation of loss of virus infectious titer of the viruses in the formulation, the miscibility of the excipients, the physico-chemical attributes required for injectable forms (osmolality, pH, absence of visible particles, excipients compatible with a parenteral route), the industrial production requirements (a freeze-drying cycle of less than 24 hours, absence of foaming or significant lyo cake collapse, optimal glass transition temperatures), the absence of reactogenicity and the acceptable appearance criteria of the lyophilisate before and after reconstitution are key criteria to reach for this vaccine. The work has two main parts: the screening of excipients and the evaluation of two artificial intelligence softwares, named C and M.

Among The three best candidate formulations derived from the excipient screening experiments, named Lead, Backup1 and Backup2, were studied in more detail. With regards to the various selection criterias, the Backup2 formulation exhibited advantages, especially in terms of the miscibility of excipients at low temperature and the stability of the virus infectious titre. Following evaluation, the software analysis results showed that the artificial intelligence algorithms are applicable for the choice of formulations with an advantage for software C which presented the best predictions for our case.

Yawen
GUO

Classique

BIOMERIEUX

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Martine JOANNES

VUCA - Appréhender l'incertitude, favoriser l'agilité et maîtriser les risques projet

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

vendredi 8 octobre - 14h50 - Jury D

VUCA, incertitude, gestion des risques, agilité, gestion de projet

Depuis le début de l'épidémie du Covid-19, l'incertitude est peu à peu devenue une préoccupation majeure des entreprises. Nombre d'entre elles sont confrontées à cette question épineuse : comment prendre les bonnes décisions et agir face à un environnement inconnu et un avenir incertain ?

Ce rapport vise tout d'abord à fournir une vue d'ensemble des différentes sources d'incertitude affectant les projets dans le secteur de la santé. Un outil essentiel pour l'analyse de l'incertitude est l'outil VUCA qui signifie Volatilité, Incertitude, Complexité et Ambiguïté. Ce concept a été introduit pour la première fois par Warren Bennis, expert en études de leadership, et Burton Nanus, auteur de multiples concepts de Management et professeur émérite à l'université de Californie du Sud. Dans leur livre *Leaders : the strategies for taking charge* publié en 1985, ils décrivent comment les grands leaders guident les organisations modernes dans un contexte de changement rapide.

L'agilité est un autre outil essentiel pour faire face à l'incertitude dans un environnement en mutation rapide. Un nombre croissant d'entreprises du secteur de la santé cherchent à passer des méthodes traditionnelles de développement à une approche agile. Cependant, le terme d'agilité couvre un large éventail de concepts et de pratiques. L'agilité peut être définie comme un état d'esprit favorisant les interactions entre les membres de l'équipe, la fonctionnalité du produit, la collaboration avec les clients et l'adaptation au changement, comme le soutiennent les 12 principes du Manifeste Agile (2001). C'est aussi une grande famille de méthodologies qui est née avec l'approche Toyota dans les années 70 représentée par les méthodes Kanban et Just in time et complétée plus tard par d'autres modèles tels que le Design Thinking, le Scrum et l'Extreme Programming.

L'objectif principal de ce rapport est de comprendre comment VUCA peut être judicieusement exploité pour promouvoir et conduire des stratégies agiles, et ainsi améliorer les procédures conventionnelles d'évaluation des risques en gestion de projet.

GRENOBLE • FRANCE

9/21/2020 → 12/3/2021

VUCA – Understanding uncertainty, driving agility, and mitigating risks of projects

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

VUCA, Uncertainty, Risk management, Agility, Project management

Since the beginning of the Covid-19 epidemic, uncertainty has slowly become a major concern for businesses. Many companies are facing this arduous question: how to make the right decision and take actions when confronted to an unknown environment and an uncertain future?

In the first place, this report aims at providing an overview of the different sources of uncertainty affecting projects in the healthcare industry. An essential tool for the analysis of uncertainty is the VUCA framework which stands for Volatility, Uncertainty, Complexity, and Ambiguity. The concept was first introduced by Warren Bennis, a scholar expert in leadership studies, and Burton Nanus, author of multiple management concepts and Professor Emeritus at the University of Southern California. In their book *Leaders: the strategies for taking charge* published in 1985, they describe how great leaders guide modern organizations to follow the proper direction in an area of rapid change.

Another key tool to face uncertainty in a fast-changing environment is agility. A growing number of companies inside the health care industry are seeking to transition from traditional product development methods to an agile approach. However, the term of agility covers a wide scope of concepts and practices. Agility can be defined as a state of mind promoting interactions between team members, product functionality, collaboration with customers and adaptation to change as supported by the 12 Principles of the Agile Manifesto (2001). It is also a large family of methodologies which was born with the Toyota approach in the 70s supported by the Kanban and Just in time methods and later completed with other models such as Design Thinking, Scrum and Extreme Programming.

The main objective of this report is to understand how the VUCA framework can be judiciously exploited to drive agile strategies and leverage conventional risk assessment procedures in project management.

Aurélien
GUY
GEM

ASGARD THERAPEUTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Cristiana PIRES

Développement de vecteurs viraux pour une reprogrammation in vivo sûre et efficace de cellules cancéreuses

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 14h00 - Jury A

Reprogrammation cellulaire, Thérapie génique, Vecteur viral, Culture cellulaire, Etude in vivo

A l'heure actuelle, seul 20% des patients répondent favorablement aux immunothérapies à cause des mécanismes d'évasion du système immunitaire mis en place par la tumeur comme son hétérogénéité et sa répression de la présentation d'antigènes.

Asgard Therapeutics est né des travaux du groupe Pereira de l'université de Lund sur la différenciation et la reprogrammation des cellules de la lignée hématopoïétique. En 2018, ils ont prouvé la capacité d'un cocktail de trois facteurs de transcription à reprogrammer des fibroblastes en cellules dendritiques fonctionnelles. Cette possibilité de reprogrammation peut s'étendre à d'autres types cellulaires, dont des cellules tumorales. Cette découverte a mené à un changement de paradigme dans le traitement du cancer par immunothérapie. En développant une thérapie génique délivrant les trois facteurs au sein de la tumeur, il serait possible de générer des cellules dendritiques présentant les antigènes de la tumeur et recrutant efficacement le système immunitaire pour la résolution de la tumeur.

La thérapie d'Asgard Therapeutics est basée sur un vecteur lentiviral délivrant les gènes des trois facteurs de transcription sous forme de polycistron mais la reprogrammation in vivo reste un défi à la fois en termes de sécurité et d'efficacité avec ce vecteur. Le but de mon stage fut, premièrement, de réaliser une étude de biodistribution in vivo pour évaluer le profil de sécurité du vecteur. Dans un second temps, j'ai réalisé une étude comparative entre différents AAV afin de sélectionner le plus efficace en termes de transduction, une première étape dans le travail d'Asgard Therapeutics pour optimiser leur vecteur et son efficacité de transduction et de reprogrammation. Pour ce faire, j'ai réalisé des analyses par qPCR et cytométrie en flux, cultivé différents types de cellules in vitro, mais aussi étendu mes connaissances sur l'utilisation de modèles de souris pour des études in vivo.

LUND • SUEDE

3/8/2021 → 8/6/2021

Development of cancer immunotherapies based on direct cell reprogramming technologies

Détruit après soutenance

Cell reprogramming, Gene therapy, Viral vector, Cell culture, in vivo study

Currently, only 20% of patients respond to available cancer immunotherapies due to the immune evasion mechanisms developed by the cancer cells during tumor progression. Tumor heterogeneity, downregulation of antigen-presentation and immunosuppressive microenvironment are hurdles to overcome in order to develop an effective immunotherapy. Asgard Therapeutics is a spin-off from the Pereira group at Lund University working at the interface between the hematopoietic and immune system and cell fate reprogramming approaches. In 2018, they identified a cocktail of three transcription factors with the ability to reprogram fibroblasts into fully functional antigen-presenting dendritic cells. Further research has demonstrated the ability to reprogram other cell types, including tumor cells. This discovery opens the opportunity for a paradigm shift in cancer immunotherapy. By developing a gene therapy able to deliver the three transcription factors directly into the tumor, cancer cells will be reprogrammed into dendritic cells that present tumor antigens and effectively recruit the immune system for tumor clearance.

Asgard Therapeutics' therapy is based on a viral vector delivering the three transcription factors genes as a polycistronic cassette but in vivo reprogramming remains challenging both in terms of safety and efficiency with this vector. The aim of my internship was, firstly, to perform an in vivo biodistribution study to evaluate the safety profile of the current vector. Secondly, I conducted a comparative study between different AAV serotypes to select the most efficient in terms of transduction, a first step in Asgard Therapeutics' work to optimize their vector and its transduction and reprogramming efficiency in vivo. To accomplish my aims, I performed qPCR and flow cytometry analysis, cultured various cell types in vitro, but also extended my knowledge on the use of mouse models for in vivo studies.

Bertrand
LALLEMAND

Classique

SANOPI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Virginie COURTOIS

Développement d'une méthode de Next-Generation Sequencing pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h50 - Jury D

Séquençage, NGS, transcriptome, bactéries, RNA-seq

Le séquençage de l'ARN par Next-Generation Sequencing (NGS), également appelé RNA-seq, peut être utilisé dans le développement de stratégies vaccinales, en identifiant l'expression des gènes de pathogènes bactériens, en culture comme lors d'une infection, et qui seraient de potentiels nouveaux candidats vaccinaux. Bien que, l'utilisation du RNA-seq par NGS chez les procaryotes présente de nombreux intérêts (résolution, sensibilité, potentiel de haut-débit) et il y a également de nombreux défis à surmonter, parmi lesquels la préservation des ARN au cours de la préparation de l'échantillon, l'enrichissement en ARNm par la déplétion des ARN abondants moins informatifs, en limitant l'introduction de biais et afin d'obtenir des données de séquençage en quantité suffisante et avec la qualité requise pour faire une analyse d'expression différentielle des gènes. De nombreuses solutions sont dorénavant proposées par les fournisseurs spécialisés. Bien qu'elle représente un coût et une durée importants au sein d'un projet, l'étape de mise au point pour trouver les meilleurs protocoles est nécessaire. Et ceci en prenant en considération la nature des échantillons à analyser et l'objectif expérimental attendu.

L'objectif de mon projet a été d'évaluer différentes approches pour réaliser ce RNA-seq, approches qui puissent être standardisées et automatisées, pour un pathogène bactérien d'intérêt pour Sanofi Pasteur. Pour cela, plusieurs études ont été réalisées pour mettre en place ces méthodes avec d'une part, l'objectif de préserver les ARN bactériens lors du prélèvement et ce jusqu'à l'extraction et, d'autre part, permettre d'enrichir l'échantillon en ARN messager en éliminant les ARN ribosomiaux et produire ainsi le matériel, appelé banque de séquençage, pour réaliser le séquençage sur une plateforme Illumina. Par ces études, une méthode a été sélectionnée et appliquée pour réaliser l'analyse d'expression de gènes au cours de la croissance en culture de cette souche bactérienne.

MARCY L'ÉTOILE • FRANCE

10/5/2020 → 10/8/2021

Development of a Next-Generation Sequencing methods to the regulation of gene expression in prokaryotes

Détruit après soutenance

Sequencing, NGS, transcriptome, bacteria, RNA-seq

RNA Sequencing by Next-Generation sequencing (NGS), also known as RNA-seq, can be used in the development of vaccine strategies, by identifying the gene expression of bacterial pathogens both in culture and during infection, that could be new vaccine candidates. Although the use of RNA-seq by NGS in prokaryotes has many advantages (resolution, sensitivity, high-throughput potential), there are also many challenges to overcome, including RNA preservation during the sample preparation, the mRNA enrichment by depletion of less informative abundant RNAs, limiting the introduction of bias, and thus obtaining sequencing data in sufficient quantity with the required quality to perform differential gene expression analysis. Now, many solutions are offered by specialized suppliers. Although it represents a significant cost and time within the project, the evaluation of the different methods is necessary. And this taking into consideration the nature of the samples to be analyzed and the expected experimental objective.

The objective of my project was to evaluate different approaches, that can be standardized and automated, to perform this RNA-seq for a bacterial pathogen of interest, Sanofi Pasteur. For this purpose, several studies have been carried out to set up these methods with the objective of preserving bacterial RNAs during sampling until purification, and to enrich the sample in messenger RNA by eliminating ribosomal RNAs and thus produce the material, sequencing libraries, for sequencing on an Illumina platform. Through these studies, a method was selected and applied to perform gene expression analysis during the growth in culture of this bacterial strain.

Marion
LAMBAULT

CP

SANOPI PASTEUR

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

Implémentation d'une sonde PAT pour le suivi de biomasse en bioréacteur et évaluation d'une isoflavone permettant d'accélérer le cycle de réplication du virus de l'hépatite A.

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 10h05 - Jury B

Culture de cellules mammaliennes, PAT, optimisation de procédé, virologie, biologie cellulaire, vaccins

La culture de cellules mammaliennes en bioréacteur joue aujourd'hui un rôle prépondérant dans bon nombre de procédés de production de thérapies innovantes. Il s'agit par nature d'un processus complexe dans lequel une parfaite maîtrise des différents paramètres est requise. Alors que la température, le pH, la pO₂ bénéficient de technologies de mesure précises, fiables permettant leurs contrôles de manière in-situ et en temps réel, le suivi de biomasse est aujourd'hui encore un paramètre trop peu monitoré. Dans ce contexte d'innovation et de digitalisation, le département Manufacturing Technology de Sanofi Pasteur est chargé d'évaluer et d'implémenter une sonde PAT permettant le suivi de biomasse en bioréacteur. Cette dernière fonctionne sur le principe de la capacitance, elle émet un faible courant alternatif dans le milieu de culture, provoquant la polarisation des cellules vivantes. Leur interaction dans ce champ électrique est alors mesurée par la sonde puis traduite en concentration cellulaire grâce à un facteur de corrélation lignée-cellulaire dépendant. L'objectif de cette étude était donc de déterminer ce facteur de corrélation pour les cellules adhérentes VERO cultivées sur microporteurs. En parallèle, une deuxième étude indépendante de la première a été menée. Elle avait pour but d'améliorer les performances de la phase de culture virale du procédé de production du vaccin contre l'hépatite A afin d'augmenter le nombre de doses produites par lot. L'étape limitante dans le cycle de réplication du virus de l'hépatite A est la traduction de l'ARN viral en polyprotéine. Des études ont mis en évidence un phénomène de compétition entre les ARNm cellulaires et viraux vis-à-vis des facteurs de traduction eIF4E et eIF4G. Ces derniers n'étant pas disponible en quantité suffisante pour assurer à la fois la production des protéines cellulaires et virales. Dans le contexte d'une production de vaccin contre l'hépatite A, cela résulte en une phase de culture virale non-optimale car particulièrement longue. Face à ce problème, une molécule de la famille des isoflavones, permettant d'augmenter le taux d'expression des gènes codant pour les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4G, a été identifiée comme solution pour accélérer le cycle de réplication du virus de l'hépatite A et donc améliorer les rendements du procédé de production. Cette étude avait donc pour objectif d'évaluer son efficacité.

MARCY L'ETOILE • FRANCE

9/14/2020 → 11/12/2021

Implementation of a PAT tool for biomass monitoring in bioreactor and evaluation of an isoflavone allowing to accelerate the replication cycle of the hepatitis A virus.

Détruit après soutenance

Mammalian cell culture, PAT, process optimization, virology, cell biology, vaccines

Mammalian cell culture in bioreactors plays a key role in the production process of many innovative therapies. It is by nature a complex and involved process in which a perfect control of the different parameters is required. While temperature, pH and pO₂ benefit from precise and reliable technologies allowing their control in-situ and in real-time, biomass monitoring is still a parameter not sufficiently mastered. In this context of innovation and digitalization, the Manufacturing Technology department of Sanofi Pasteur is in charge of evaluating and implementing a PAT probe allowing the monitoring of biomass in bioreactors. This probe relies on the principle of capacitance measurement. It emits a weak alternating current in the culture medium, causing the polarization of living cells. Their interaction in this electric field is then measured by the probe and translated into a cell concentration using a correlation factor cell-line specific. The purpose of this study was to determine this correlation factor for VERO adherent cells on microcarriers.

At the same time, a second independent study was conducted. The purpose of this study was to improve the performance of the viral culture phase of the hepatitis A vaccine production process in order to increase the number of doses produced per batch.

The limiting step in the hepatitis A virus replication cycle is the translation of viral mRNA into a polyprotein. Studies have shown that there is a competition between cellular and viral mRNAs towards the translation factors eIF4E and eIF4G. The latter are not available in sufficient amounts to ensure the production of both cellular and viral proteins. In the context of a hepatitis A vaccine production process, this results in a non-optimal viral culture step because it is particularly long. To solve this problem, a molecule belonging to the isoflavone family and allowing to increase the expression rate of the coding genes for the translation initiation factors eIF4E and eIF4G was identified to accelerate the replication cycle of the hepatitis A virus and thus improve the yields of the production process. The objective of this study was to evaluate its effectiveness.

Tristan
LE RUYET

CP

SANOFI CHIMIE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Juliette HAVEL

Développement et optimisation de méthodes de production d'un métabolite secondaire

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h50 - Jury B

Fermentation, Raman, UHT, microbiologie, développement de procédés

Dans le cadre d'un projet de modification du procédé de production d'un métabolite secondaire utilisé en pharmacie et en alimentation animale, il est nécessaire de pouvoir monitorer la croissance des bactéries productrices de celui-ci. L'optimisation de la croissance et la production implique la définition des concentrations de trois composés principaux. La technique de spectrométrie Raman a été étudiée pour suivre en temps réel l'évolution de substrats clés et du produit d'intérêt. Après sélection et mise en place d'un équipement Raman (sonde + spectrophotomètre), un modèle d'analyse des spectres Raman a été développé. Le but de celui-ci est de suivre l'évolution de trois composés : deux substrats essentiels à la croissance bactérienne et la production, et le produit d'intérêt issu de la fermentation. Celui-ci est ensuite extrait et purifié avant sa commercialisation. Afin de libérer l'intégralité de ce composé des cellules bactériennes vers le milieu pour assurer le meilleur rendement d'extraction possible, il est nécessaire d'inactiver les bactéries, puis de les lyser par destruction des membranes cellulaires. La première étape est réalisée avec une acidification du moût de fermentation, afin de rendre le moût non revivifiable, en accord avec les recommandations du Haut Conseil des Biotechnologies sur le rejet de micro-organismes OGM. Cette étape a été optimisée pour garantir son efficacité en un temps minimal. La deuxième étape est réalisée grâce à une méthode de lyse thermique en continu, pour laquelle les paramètres optimaux de fonctionnement (température et temps de chambrage) ont été déterminés au laboratoire. Toutes ces expériences ont été menées dans le but de développer le procédé de production à l'échelle industrielle.

SAINT-AUBIN-LES-ELBEUF • FRANCE

10/5/2020 → 10/8/2021

Développement et optimisation de méthodes de production d'un métabolite secondaire

Détruit après soutenance

Fermentation, Raman, UHT, microbiologie, développement de procédés

As part of a project aiming to modify the production process of a secondary metabolite used in pharmaceuticals and feed, it is necessary to be able to monitor the growth of the producer bacteria. Optimization of growth and production involves setting the concentrations of three main compounds. Raman spectrometry technology was evaluated to follow in real time the evolution of key substrates and the product of interest. After selection and installation of a Raman equipment (probe + spectrophotometer), an analysis model for the gathered Raman spectra was developed. Its purpose is to follow the evolution of three compounds: two substrates essential for bacterial growth and production, and the product of interest resulting from fermentation. Said product is then extracted and purified before being marketed. In order to release all of this compound from the bacterial cells to the medium, it is necessary to inactivate the bacteria and lyse them by destroying the cell membranes. The first step is carried out with an acidification of the fermentation broth, to render it non-revivable, in accordance with the recommendations of the High Council of Biotechnologies on the GMO microorganisms wastes. This step has been optimized to ensure its efficiency in minimal time. The second step is carried out using a continuous thermal lysis method, for which the optimal operating parameters (temperature and holding time) have been determined in the laboratory. All these experiments were carried out with the aim of developing the manufacturing process at industrial scale.

Paul
LECOMPTE-
SAINT-JEAN

CP

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Virginie DAYEZ

Qualification de matières premières dans le cadre d'un transfert de procédé

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 16h05 - Jury B

Vaccins, Single use, Qualification, Production, Gestion de projet

Lorsqu'une industrie pharmaceutique prend la décision de transférer un de ses procédés de l'un de ses sites de production à un autre cela représente un investissement important, aussi bien en termes de coût que de temps. Ceci est en majeure partie due au fait que pour qu'un procédé soit implémenté sur un site respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), il doit passer les étapes complètes du cycle de la validation. C'est ici le cas pour le site de Saint-Amands-Les-Eaux (59, Nord), où est transféré la formulation du bulk intermédiaire entrant dans la composition des vaccins antitétaniques et antidiphtérique (gamme Boostrix et Infanrix). Ce projet de plusieurs millions d'euros est également l'occasion d'améliorer le procédé en partie grâce à l'implémentation de nouvelles technologies à usage unique. En effet, dans sa conception actuelle le procédé nécessite des isolateurs contraignants d'utilisation. Un système de connexion aseptique et des poches de stockage adaptées, permettront de s'exempter de cette contrainte. Ainsi, depuis la réception des différentes valences jusqu'à l'obtention du bulk multivalent, le produit ne sera jamais en contact avec l'environnement aseptique, on appelle ceci un système fermé. Les poches créées puis utilisées dans ce nouveau procédé doivent être qualifiées afin de s'assurer qu'elles correspondent non seulement aux besoins établis par les techniciens de production, mais aussi aux réglementations en vigueur. Pour ce faire, le processus de validation suit des étapes très détaillées, ayant chacune leur but précis. Mon rôle va donc être de qualifier ces poches pour pouvoir autoriser leur utilisation en production. Ce sujet pluridisciplinaire va nous permettre de découvrir les missions prises en charge par un service support de la production, et la réalité de manipuler dans un espace contrôlé lors de l'exécution des protocoles.

SAINT AMAND LES EAUX • FRANCE

10/5/2020 → 12/3/2021

Qualification de matières premières dans le cadre d'un transfert de procédé

Détruit après soutenance

Vaccins, Single use, Qualification, Production, Gestion de projet

When a pharmaceutical industry makes the decision to transfer a process from one of its production sites to another, it represents a significant investment, both in terms of cost and time. This is mainly due to the fact that to implement a new process in a GMP compliant site, it must go through the full validation cycle. This is the case for the Saint-Amands-Les-Eaux site (59, Nord), where is transferred the formulation of the intermediate bulk used in the composition of tetanus and diphtheria vaccines (Boostrix and Infanrix range). This multi-million-euro project is also an opportunity to improve the process mainly through the implementation of new single-use technologies. Indeed, in its current design, the process requires isolators used with constraints. An aseptic connection system and adapted storage bags will allow to be exempted from this constraint. Thus, from the reception of the different valences until the multivalent bulk is obtained, the product will never be in contact with the aseptic environment, this is called a closed system. The bags created and used in this new process must be qualified to ensure that they meet not only the needs established by the production technicians, but also the regulation. To do this, the validation process follows very detailed steps, each with its own specific purpose. My role will be to qualify these bags in order to authorize their use in production. This multidisciplinary subject will allow us to discover the missions taken in charge by a production support service, and the reality of handling in a controlled space during the execution of protocols.

Edouard
LESTIN

CP

INRAE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Robert VAN LIS

Etude des interactions entre les communautés bactériennes de fermentation sombre et des microalgues en conditions mixotrophes.

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

jeudi 7 octobre - 14h00 - Jury B

Bioremédiation/Environnement – Autre (Etude d'interaction entre communauté bactériennes et microalgues)

La fermentation sombre est un procédé au cours duquel un inoculum bactérien mixte est cultivé en conditions d'anaérobiose en utilisant des substrats organiques complexes tels que des effluents industriels ou des eaux usées. A l'heure actuelle, les rendements en hydrogène obtenus lors de la fermentation sombre (environ 33%) ne sont pas suffisants pour rentabiliser ce procédé. Cependant, à la fin de cette fermentation, différents produits d'intérêts, dont des acides gras volatiles (AGV) sont retrouvés dans les effluents de culture.

Parmi ces AGV, l'acétate et le butyrate sont des composés assimilables par différentes souches de microalgues. L'utilisation de cet effluent comme milieu pour cultiver des microalgues est donc un couplage à fort potentiel. En effet, en plus de contribuer à la bioremédiation du milieu de par la consommation d'AGV, la culture de microalgues permet la production d'une biomasse apportant de la valeur au procédé. Pour permettre cette association, différents points, tels que l'impact de communautés bactériennes issues de la fermentation sombre restent à élucider. L'objectif de ce projet est d'obtenir une meilleure compréhension des interactions entre microalgues et communautés bactériennes ainsi que d'évaluer l'impact de ces interactions sur le métabolisme des microalgues. Par ailleurs, la teneur en lipides et sucres des microalgues est mesurée afin de produire du biocarburant avec celles-ci.

Pour jauger l'effet des communautés bactériennes sur leur croissance, cinq souches de microalgues ont été cultivées sur des effluents de fermentation sombre avec ou sans bactéries. Différents paramètres de croissance ont été mesurés tels que les rendements de conversion, les taux de croissance des microalgues, l'évolution des communautés bactériennes ainsi que la production de lipides et de sucres. Les résultats obtenus suggèrent un impact positif des bactéries, qui accélèrent la consommation des AGV tout en favorisant la croissance de certaines microalgues.

NARBONNE • FRANCE

3/22/2021 → 9/21/2021

Study of interactions between bacterial communities from dark fermentation and microalgae in mixotrophic conditions.

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Bioremediation/Environment – Other (Study of interactions between bacterial communities and microalgae)

Dark fermentation (DF) is a process during which bacterial communities are cultivated to produce hydrogen in anaerobic conditions, using complex organic substrates such as wastewater or waste from the food industry. Hydrogen production yields are currently about 33%, which is not enough to allow the industrial development of dark fermentation alone. However, several products such as volatile fatty acids (VFAs) are detected in the effluents, especially acetate and butyrate, which can be used to cultivate certain microalgae species.

To increase the cost effectiveness of the process, coupling the cultivation of microalgae to dark fermentation effluent appeared to be a viable option. It should enhance the waste removal from the effluent, in addition to promoting the generation of bioproducts by the microalgae. In order to evaluate the efficiency of this coupling, several factors such as interactions between microalgae and bacteria have to be studied. The aim of my internship was to obtain a better understanding of the impact of bacterial communities from the dark fermentation process on microalgal physiology. The lipid and sugar productivity of each microalga were also determined in order to evaluate the biofuel potential of that biomass after their growth on dark fermentation effluent.

For that purpose, during this project five different strains were assessed separately employing DF effluent as carbon source with and without bacteria. Their biomass yields and growth rates, substrates consumption as well as their lipid and sugar content, were evaluated. Additionally, the evolution of bacterial community during the cultures was also followed. The analysis of those different results together lead to the conclusion that the presence of bacteria appeared to enhance mixotrophic metabolism of microalgae as well as permitting a better removal of VFAs in the effluent.

Margot
MAHIEUX

CBI

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Marie MORILLE

Utilisation de Vésicules Extracellulaires pour la Vectorisation Intracellulaire de Protéines

Rapport confidentiel
Soutenance non confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h00 - Jury D

Vésicules Extracellulaires, Exosomes, Administration intracellulaire de protéines, drug delivery, agrégation, séparation de protéines, anticorps

Antonin
MARQUANT

CBI

Les Vésicules Extracellulaires (EVs) représentent une alternative prometteuse aux vecteurs synthétiques tels que les liposomes pour l'administration intracellulaire de protéines, en particulier. En effet, ces fragiles biomolécules sont généralement incapables de pénétrer naturellement les membranes cellulaires. Pourtant l'apport intracytoplasmique de protéines permettrait d'interagir avec un grand nombre de cibles intracellulaires, ouvrant ainsi de nombreuses pistes thérapeutiques.

L'objectif de ce stage était d'évaluer le chargement d'une protéine extrinsèque au sein d'EVs produits par des cellules souches mésenchymateuses murines (mMSC), et d'étudier l'intérêt de ce chargement pour faciliter l'internalisation cellulaire de cette protéine. Afin d'établir la preuve de concept de l'encapsulation de protéines dans les EVs, nous avons utilisé comme protéine modèle un fragment scFv marqué GFP et dirigé contre la tubuline intracytoplasmique (scFv-GFP). En effet, cette protéine permet le suivi de la protéine chargée et de son activité biologique par la capacité de marquage de la tubuline au sein de cellules et sa fluorescence. Différents protocoles ont été utilisés afin d'associer EV et scFv, impliquant des techniques physiques (lyophilisation, cycles de (dé)congélation et bains à ultrason) éventuellement en association avec des liposomes cationiques (DOTAP:DOPE). Une méthode de séparation utilisant des billes recouvertes de nickel utilisant la présence d'un tag Histidine sur les scFv-GFP a été mise en place, permettant d'en estimer le taux d'encapsulation. Enfin, l'efficacité d'internalisation cellulaire a été évaluée au sein de cellules mMSC.

Ce travail préliminaire et exploratoire a permis d'identifier une méthode efficace de séparation EV/scFv-GFP, de mieux comprendre le comportement des scFv-GFP à chaque étape des protocoles de chargement préalablement évalué, et d'essayer de mieux comprendre la nature de leurs interactions avec les EVs.

MONTPELLIER • FRANCE

3/22/2021 → 9/22/2021

Utilisation de Vésicules Extracellulaires pour la Vectorisation Intracellulaire de Protéines

Détruit après soutenance

Vésicules Extracellulaires, Exosomes, Administration intracellulaire de protéines, drug delivery, agrégation, séparation de protéines, anticorps

As natural vectors for biomolecules, Extracellular Vesicles (EVs) are increasingly being studied for multiple applications. Fully biocompatible, they represent a promising alternative to synthetic vectors, such as liposomes, for the intracellular delivery of proteins. Indeed, these biomolecules are generally unable to penetrate cell membranes naturally. However, due to their bioactivity, the intracytoplasmic delivery of proteins would make it possible to interact with many intracellular targets, thus opening up numerous therapeutic possibilities.

In this context, the objective of this internship was to evaluate the loading of an extrinsic protein into EVs produced by murine mesenchymal stem cells (mMSCs), and to study the interest of this loading to facilitate the cellular internalization of this protein. Thus, in order to establish the proof of concept of protein encapsulation in EVs, we used as a model protein a GFP-tagged scFv fragment directed against intracytoplasmic tubulin (GFP-scFv/ α tub). Indeed, this GFP-scFv/ α tub allows a monitoring both loaded protein and its biological activity by the ability to label the tubulin within cells. Different protocols have been used to combine EV and scFv, involving either purely physical techniques (freeze-drying, freeze-thaw cycles and ultrasound baths) or techniques involving the combination of cationic liposomes (DOTAP: DOPE). A separation method using nickel-coated beads and based on the presence of a Histidine tag on the scFv-GFP was set up and optimised. Thus, purified samples of free scFv-GFP after EV loading were separated in order to estimate their encapsulation rate. The efficiency of cell internalisation was then assessed in mMSC cells.

This preliminary and exploratory work allowed us to identify an efficient method for EV/scFv separation, to better understand the behaviour of scFv-GFP at each step of the previously evaluated loading protocols, and to try to better understand the nature of their interactions with EVs.

CEA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Florian DELRUE

Adaptation de microalgues pour plus de résistance à un effluent toxique

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

jeudi 7 octobre - 14h00 - Jury C

Microalgues, Optimisation de culture, Evolution adaptative, Effluent, Culture continue

Depuis ces dernières années, les biocarburants se sont fortement développés ainsi que les différentes méthodes permettant de recycler les quelconques effluents générés par leurs procédés de fabrication. Ce rapport s'inscrit dans le cadre du projet ANR RafBioAlg et vise à explorer une filière de valorisation thermochimique et catalytique de microalgues pour la production de biocarburants. Le procédé étudié, la liquéfaction hydrothermale (HTL), produit une huile qui doit être ensuite raffinée pour produire du biocarburant et plusieurs coproduits, notamment un effluent aqueux (AP) qui peut être valoriser par recyclage dans la culture de microalgues. L'AP étant composée d'éléments toxiques pour les microalgues, la technique de l'adaptation évolutive en laboratoire (ALE) a été utilisée afin d'acclimater la culture et développer une résistance à la toxicité de cet effluent. Pour ce faire, *Chlorella vulgaris* NIES 227, une microalgue sélectionnée pour sa forte productivité en lipide (principal composé transformé en huile lors de l'HTL), a été cultivée en culture continue en photobioréacteur d'1L avec des milieux contenant une concentration croissante d'AP. Après une acclimatation progressive, il a été possible d'augmenter la concentration d'AP de 0,167% à 0,33% sans effets néfastes sur la culture, passant d'un taux de croissance de 0,6 jour⁻¹ à 1,7 jour⁻¹. Enfin, différentes expériences en incubateurs ont été effectuées afin d'étudier plus précisément la toxicité de l'AP et la façon dont sa composition, différentes selon les conditions d'HTL, affecte les cultures. Une corrélation entre les proportions en azote et carbone totales (TN et TC) et le taux de croissance des microalgues a été observée. En effet, il semblerait que plus le TN et TC sont élevés plus l'AP est toxique pour les microalgues puisqu'une diminution des taux de croissance est observée jusqu'à un minimum de 20% du taux de croissance du contrôle.

SAINT-PAUL-LÈS-DURANCE • FRANCE

3/29/2021 → 9/30/2021

Adaptation of microalgae for more resistance to a toxic effluent

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Microalgae, Culture optimization, Adaptive evolution, Effluent, Continuous culture

Over the past few years, biofuels have been considerably developed, as well as the various methods of recycling the effluent generated during the manufacturing process. This report is part of the ANR RafBioAlg project, which aims to explore the thermochemical and catalytic recovery of microalgae for biofuel production. The studied process, hydrothermal liquefaction (HTL), produces an oil that must be later refined to become a biofuel, and several by-products. The aqueous phase (AP) effluent, one of these by-products, and can be recycled into the microalgae culture. However, the AP is composed of elements that are toxic for microalgae growth. The laboratory evolutionary adaptation (ALE) technique was used to acclimate the culture and develop resistance to the effluent's toxicity. To that end, *Chlorella vulgaris* NIES 227, a microalga selected for its high lipid productivity (main compound processed into oil during HTL) was grown in continuous culture in a 1L photobioreactor with media containing an increasing concentration of AP. After a gradual acclimatisation, it was possible to double the AP content from 0.167% to 0.33% without observed negative effects on the culture, while improving the growth rate from 0.6 day⁻¹ to 1.7 day⁻¹. Finally, different batch experiments were carried out to study more precisely the toxicity of the AP and how its concentration and composition, varying according to HTL conditions, affects the culture. A negative correlation between the concentrations of total nitrogen (TN), total carbon (TC) and microalgae growth rate was observed. Indeed, it would appear that higher TN and TC concentrations, resulted in lower microalgae growth rates, going down to 20% of the control's growth rate.

Marion
MARTIN
CBI

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. François SIGONNEAU

Gestion de projets de fabrication clinique de produits finis injectables en sous-traitance

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 09h15 - Jury D

Médicaments injectables, fabrication clinique, Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), sous-traitance/CDMO, gestion de projets

Sanofi, en perpétuel élargissement de son portefeuille de molécules biologiques thérapeutiques, réalise de nombreux essais cliniques en vue de l'approbation et de la mise sur le marché de ces molécules. Les activités de Fill & Finish représentent une étape essentielle de la production des médicaments injectables. Pour cette étape, les capacités internes de production de Sanofi R&D ne permettent pas de satisfaire la demande de production de lots pour essais cliniques. Dans ce contexte, ces activités sont régulièrement sous-traitées à des CDMO spécialisées dans le remplissage aseptique.

Ce projet de fin d'études s'est déroulé au sein du département CIM (Clinical Injectable Manufacturing) Vitry de Sanofi R&D qui est en charge des fabrications des produits injectables, en interne ou en sous-traitance.

Au cours de ce stage, mon rôle a été coordonner le transfert des projets de fabrication en sous-traitance chez des CDMO. Pour chaque projet, et dans le respect des BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) afin de garantir la qualité et la sécurité des produits pharmaceutiques fabriqués, les missions sont de : 1) Consolider les formulations et les procédés de fabrication proposés par les équipes de développement pharmaceutique et évaluer leur extrapolation en pilote BPF chez le sous-traitant, 2) Assurer la faisabilité de la production d'un point de vue analytique, logistique, qualité..., 3) Rédiger en collaboration avec l'ensemble des partenaires du développement pharmaceutique et le CDMO un cahier des charges spécifique à chaque projet à destination du CDMO, 4) Approuver les instructions de fabrication (ou Plan maître), 5) Suivre la fabrication des lots cliniques, 6) Rédiger les rapports de lot et compiler les dossiers de lot de fabrication pour permettre la libération et l'utilisation en essai clinique des médicaments fabriqués.

VITRY SUR SEINE • FRANCE

3/1/2021 → 8/27/2021

Gestion de projets de fabrication clinique de produits finis injectables en sous-traitance

Détruit après soutenance

Injectable drugs, clinical manufacturing, GMP (Good Manufacturing Practices), outsourcing, CDMO, project management

Sanofi is constantly expanding its portfolio of therapeutic biological compounds and conducts numerous clinical trials prior to the approval and the marketing of these compounds. Fill & Finish activities are an essential step in the production of injectables. For this step, Sanofi R&D's internal production capacities are not sufficient to meet the production demand for clinical trials. In this context, Fill & Finish activities are regularly outsourced to CDMOs specialized in aseptic filling.

This end-of-studies project took place in the CIM (Clinical Injectable Manufacturing) department of Sanofi R&D, which oversees injectable products manufacturing (internally or outsourced).

During this internship and as a project manager, my role was to coordinate the transfer of clinical manufacturing projects to CDMOs. For each project and in compliance with GMP in order to guarantee the quality and safety of pharmaceutical products, the missions are: 1) To consolidate the formulation and the manufacturing process proposed by the pharmaceutical development teams and to evaluate their extrapolation in GMP pilot at the subcontractor, 2) To ensure the feasibility of the manufacture from analytical, logistic and quality point of view, 3) To write the technical specifications of each project for the CDMO in collaboration with all the pharmaceutical development partners and the CDMO, 4) To approve the fabrication instructions provided by the CDMO, 5) To monitor the manufacturing of clinical batches (in person or remotely), 6) To review and compile Manufacturing Batch Records to allow the release and the use of the injectable drug manufactured in clinical trials.

Clémence
MORA

Classique

Ciloa SAS

MONTPELLIER • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Bernadette TRENTIN

3/8/2021 → 9/10/2021

Développement d'exosomes à potentiel thérapeutique pour le traitement de maladies génétiques rares

Development of exosomes with therapeutic potential as treatment for some genetic rare disorders

Rapport confidentiel

Détruit après soutenance

Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 09h15 - Jury C

Maladies génétiques rares, enzymes lysosomales, exosomes, vecteur thérapeutique

Genetic rare disorders, lysosomal enzymes, exosomes, therapeutic vector

L'intérêt pour les exosomes comme outil thérapeutique est grandissant. Petites vésicules naturellement produites par toutes les cellules, les exosomes sont connus pour jouer un rôle fondamental dans la communication intercellulaire. La société Ciloa, où j'ai eu l'opportunité de réaliser mon projet de fin d'étude, est spécialisée dans la production d'exosomes « customisés ». Créée en 2011 par le Dr Mamoun sur deux familles de brevets permettant l'adressage de protéines à la surface et dans l'exosome, elle articule son activité autour de trois applications préventives et thérapeutiques des exosomes : les vaccins, les anticorps thérapeutiques et les vecteurs thérapeutiques. C'est dans la composante vecteur thérapeutique que s'inscrit le projet qui m'a été confié. Le projet a consisté à développer des exosomes recombinants portant différentes enzymes lysosomales pour le traitement de maladies génétiques rares que sont les maladies de surcharges lysosomales. Ces maladies sont caractérisées par un déficit total ou partiel en une enzyme lysosomale qui se traduit par une accumulation de son substrat. Bien qu'il existe des traitements pour certaines maladies par remplacement de l'enzyme déficiente, ces traitements restent onéreux car ces enzymes sont complexes à produire. C'est là tout l'intérêt du projet proposé par Ciloa. Les exosomes pourraient ainsi permettre de produire plus aisément ces protéines sous une forme moins onéreuse. L'objectif du stage était donc d'obtenir trois types d'exosomes recombinants exprimant à leur surface une enzyme lysosomale d'intérêt. Dans un premier temps, les gènes codant pour les enzymes ont été clonés dans le vecteur d'expression propriété de Ciloa permettant l'adressage de protéines aux exosomes. Dans un second temps, ces constructions ont été transfectées dans des cellules eucaryotes et les exosomes recombinants produits ont été purifiés et caractérisés.

The interest in exosomes as therapeutic tool is increasing. As small vesicles naturally produced by all cell types, exosomes are known to play key roles in intercellular communications. Ciloa a biotech company, that gave me the opportunity to accomplish my internship, is specialised in exosome customisation. Created in 2011 by Dr Mamoun on two patent families for protein targeting at the surface and into the exosomes, Ciloa develops three preventive and therapeutic applications of exosomes: vaccines, therapeutic antibodies, and therapeutic vectors. The project I was entrusted with, enters into the therapeutic vector application. It consists of developing recombinant exosomes harbouring lysosomal enzymes for the treatment of some genetic rare diseases: the lysosomal storage disorders. These diseases are characterised by a total or partial lack of a lysosomal enzyme which lead to the enzyme substrate accumulation. Treatments are available for some of these diseases by enzyme replacement, but they are very expensive due to the complexity of their production. Exosomes expressing these enzymes would allow an easier production of these enzymes and at a cheaper price. The internship aim was to obtain three types of recombinant exosomes expressing at their surface a lysosomal enzyme of interest involved in a lysosomal storage disorder. Firstly, the genes encoding for the enzymes were cloned into Ciloa's proprietary expression vector allowing the enzyme targeting to the exosome. Secondly, the molecular constructions were used to transfect eukaryotic cells and the recombinant exosomes produced were purified and characterised.

Julia
MOULIN
Classique

Hôpital Cochin - AHPH

PARIS • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Bénédicte OULES

4/6/2021 → 8/27/2021

Etude du transcriptome cutané pour la personnalisation du traitement de maladies dermatologiques non classées

Use of skin transcriptome in personalized medicine of unclassified inflammatory skin diseases

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

vendredi 8 octobre - 10h05 - Jury A

Maladie inflammatoire dermatologique, maladie non classifiée, médecine personnalisée, RNA-seq, expression différentielle, modèle de classification, analyse fonctionnelle, déconvolution des populations cellulaires

Inflammatory skin disease, non-classified disease, RNA-seq, differential expression, classification model, functional analysis, cell type deconvolution

Lisa
OTSUKA

Mobilité

La médecine personnalisée est une approche médicale visant à adapter les traitements en fonction des caractéristiques des patients et de leur maladie, en particulier sur la base de informations issues de la génomique et de technologies haut-débit (variants génétiques, profil d'expression des gènes,...). L'étude clinique PIMOC promue par l'Assistance Publique — Hôpitaux de Paris vise à proposer un traitement personnalisé à des patients atteints de maladies inflammatoires non classées multisystémiques avec atteinte cutanée. Le choix de leur traitement est fait par un comité scientifique parmi une liste de molécules prédéfinies, sur la base de l'analyse transcriptomique de biopsies de peau saine et lésée.

Personalized medicine is a field of medicine which leverages additional data obtained from genomic medicine and other high-throughput technologies to provide patients with a tailor-made treatment. The PIMOC clinical trial sponsored by the AP-HP aims at giving a personalized treatment to patients suffering from inflammatory non-classified multi-organ diseases affecting skin. The treatment is selected among a list of targeted therapies by a scientific committee, relying on transcriptomic analysis of lesional and control skin biopsies. This internship is about developing a pipeline analyzing that transcriptomic data and creating an informative and concise report for the committee. The personalized approach is here a challenge because transcriptomic data analysis is usually performed by differential expression analysis that requires several replicates. Thus, the pipeline was optimized so that its results are the most similar from those of differential expression analysis. Both analyses were performed in parallel on public datasets of groups of patients with known diseases.

L'objectif de ce stage est de développer un pipeline d'analyse de ces données transcriptomiques générant un rapport d'analyse interprétable par le comité. L'approche personnalisée représente un défi pour l'analyse car les analyses de données transcriptomiques sont classiquement traitées par analyse d'expression différentielle nécessitant la présence de réplicats. Le pipeline d'analyse a donc été optimisé afin que ses résultats soient au plus proches de ceux obtenus par analyse d'expression différentielle. Ainsi, les deux analyses ont été menées parallèlement sur des jeux de données publiques de groupes de patients atteints de maladies connues.

The analysis begins with the comparison of genes expression levels between lesional and control skin. This comparison enables to identify overexpressed genes in lesional skin. The second part of the analysis focuses on adding biological insight to the results. Overrepresentation analysis and gene set enrichment analysis are performed to determine the biological pathways activated by the overexpressed genes. Finally, a cellular deconvolution algorithm is used to estimate cell types proportions in each skin sample.

L'analyse comporte une première partie ayant pour but de classer les gènes en identifiant ceux qui sont surexprimés dans la peau lésée par comparaison de leur niveau d'expression, puis une seconde partie proposant une interprétation de ces données, aux niveaux fonctionnel et cellulaire. Des analyses de surreprésentation et d'enrichissement sont menées afin de déterminer les voies biologiques pouvant être activées par les gènes classés comme surexprimés. Enfin les données transcriptomiques sont utilisées afin d'estimer les populations cellulaires présentes et leurs proportions dans chacun des échantillons.

VIVEBIOTECH S.L.

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Soledad BANOS MATEOS

Conception, génération and caractérisation fonctionnelle d'une lignée cellulaire exprimant un leurre moléculaire soluble pour capturer les vecteurs lentiviraux

*Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle*

jeudi 7 octobre - 11h10 - Jury A

Vecteur lentiviral - Culture cellulaire - Génie génétique - Protéine recombinante - Analyse moléculaire

Les procédés actuellement utilisés pour la production de vecteurs lentiviraux pour les thérapies géniques, ne permet qu'un très faible rendement, atteignant d'après certaines études seulement 0,1% à 1% de ce qu'il est théoriquement possible de produire, sans perte. Ceci est dû en parti à l'étape de production elle-même. De fait, les vecteurs lentiviraux utilisés sont pseudotypés VSV-G, ce qui leur permet une interaction avec le récepteur LDLR présent sur la plupart des cellules humaines, dont cellules du patient destinées à recevoir la thérapie génique et être infectées par le vecteur lentiviral. Les cellules utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux présentent ce même type de récepteurs LDLR et concèdent donc également l'entrée des virus qu'elles produisent. Ceci, ajouté au caractère SIN (Self-Inactivating Vector) des vecteurs les rendant ainsi non répliquables, alors incapables d'infecter plus d'une cellule au cours de leur vie, entraîne une perte définitive des vecteurs ayant subit une réinsertion.

Mon projet de stage a donc été d'optimiser le rendement de production des vecteurs lentiviraux en

travaillant sur l'inhibition de l'interaction entre les cellules productrices et les vecteurs viraux. Des techniques d'analyse cellulaire et moléculaire ont d'abord été utilisées afin d'étudier la capacité d'une protéine, disponible commercialement puis produite de façon transitoire par des cellules HEK293T, à agir comme un leurre pour interférer dans la re-transduction des vecteurs dans les cellules productrices. Un plasmide contenant la séquence codante pour le leurre a été produit et utilisée pour créer une lignée cellulaire recombinante, conçue en utilisant un système de recombinaison élaboré par l'entreprise. Cette lignée cellulaire devait permettre à la fois la production des vecteurs lentiviraux et la production de leurres moléculaires empêchant la transduction lors de la production, tout en préservant leur viabilité pour la thérapie génique. Après des étapes de production et de sélection, la lignée cellulaire recombinante a été caractérisée et leur capacité à produire les leurres moléculaires stables et spécifiques a été testée par différents moyens.

SAN SEBASTIAN-DONOSTIA • ESPAGNE

4/1/2021 → 9/30/2021

Engineering, generation and functional characterization of a cell line expressing soluble molecular decoys to capture lentiviral vectors

Détruit après soutenance

Cell culture - Genetic engineering - Recombinant protein - Molecular analysis - Lentiviral vector

The processes currently used to produce lentiviral vectors for gene therapy allow a very low yield, reaching, according to some studies, only 0.1% to 1% of what is theoretically possible to produce, without loss. This is partly due to the production step itself. In fact, the lentiviral vectors used are VSV-G pseudotyped, which allows them to interact with the LDLR receptor present on most human cells, including the patient's own cells intended to receive the gene therapy and to be infected by the lentiviral vector. The cells used for the production of lentiviral vectors have this same type of LDLR receptor and therefore also allow the viruses they produce to enter. This, together with the SIN (Self-Inactivating Vector) character of the vectors making them non-replicable, and therefore unable to infect more than one cell in their lifetime, leads to a permanent loss of the vectors that have undergone re-transduction.

My internship project was therefore to optimise the production yield of lentiviral vectors by working on the inhibition of the interaction between the producer cells and the viral vectors. Cellular and molecular analysis techniques were first used to study the ability of a protein, commercially available and then transiently produced by HEK293T cells, to act as a decoy to interfere with the re-transduction of the vectors in the producing cells. A plasmid containing the coding sequence for the decoy was produced and used to create a recombinant cell line, designed using a recombination system developed by the company. This cell line had to allow both the production of lentiviral vectors and the production of molecular decoys to prevent transduction during production, while maintaining their viability for gene therapy. After production and selection steps, the recombinant cell line was characterised and their capacity to produce the stable and specific molecular decoys was tested by different means.

Amandine
PELLETIER

Classique

TREEFROG

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

Etude de l'effet de divers paramètres d'encapsulation sur la distribution des cellules au sein des capsules et traitement de ces dernières en fin de culture en bioréacteur pour la création de banques cellulaires

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 11h10 - Jury D

Optimisation de procédés, thérapie cellulaire, culture d'iPSC, encapsulation de cellules, comptages cellulaires, cryoconservation

Les cellules souches sont des cellules non différenciées, caractérisées par leur capacité d'autorenouveau et de différenciation. En 2006, Takahashi et Yamanaka ont identifié quatre facteurs permettant d'induire la pluripotence, produisant de cette façon les premières cellules souches pluripotentes induites (iPSC).

Leur production soulève cependant des problématiques liées à leur méthode de culture. Une culture en 2D implique l'utilisation de vastes surfaces, et ne permet d'atteindre que de faibles rendements principalement à cause de l'espace limité et de l'accès inégal aux nutriments. La technologie de Treefrog Therapeutics, C-StemTM, consiste à cultiver des iPSC en 3D au sein de capsules d'alginate qui reproduisent des conditions in vivo, où les cellules s'organisent en cystes. Elles sont notamment protégées des contraintes de cisaillement dues à l'agitation. Cette technique permet de forts rendements, comme prouvé en mars 2021 par la production de 15 milliards de cellules souches dans un bioréacteur IOL, avec un facteur d'amplification de 276 en 6,5 jours.

L'entreprise cherche à présent à poursuivre le développement d'une plateforme d'encapsulation, d'amplification d'iPSC et de différenciation cellulaire. — Pour cela, il est nécessaire de développer des méthodes de caractérisation des lots de capsules, afin de les comparer entre eux dans le cadre d'une optimisation et également de définir une gamme d'acceptation pour une future production BPF.

Dans un premier temps l'objectif de ce stage a été le développement d'outils de caractérisation des capsules, dans le but d'analyser l'effet de leur taille et de la concentration cellulaire utilisée lors de l'encapsulation sur la distribution des cellules et leur amplification. Ces paramètres peuvent ensuite être adaptés en fonction des objectifs des différents projets.

La seconde mission a été le développement d'une méthode de récolte et de congélation d'une forte production d'iPSC en bioréacteur.

PESSAC • FRANCE

3/4/2021 → 9/4/2021

Study of the effect of several encapsulation parameters on the distribution of cells within capsules and processing of the latter after a bioreactor culture for the creation of cell banks

Détruit après soutenance

Process optimization, cell therapy, iPSC culture, cell encapsulation, cell counts, cryoconservation

Stem cells are undifferentiated cells, characterized by their ability to self-renew and to differentiate. In 2006, Takahashi and Yamanaka identified four factors inducing pluripotency, and thus produced the first induced pluripotent stem cells (iPSC)

Their production raises several problems linked to their method of culture. 2D culture requires vast surfaces and only leads to low yields, in particular because of the limited space and the unequal access to nutrients. The technology developed by Treefrog Therapeutics, C-StemTM, consists in cultivating iPSC in 3D within alginate capsules which reproduce in vivo conditions, where cells organize into cysts. They are protected from shear stress due to stirring. This method leads to high yields, as achieved in March 2021 with the production of 15 billion stem cells in a IOL bioreactor, with an amplification factor of 276 in 6,5 days.

The company is now focused on pursuing the development of a platform dedicated to the encapsulation and amplification of iPSC, and to cell differentiation. Therefore, it is necessary to precisely characterize each batch, in order to compare them in the context of an optimization or to define a GMP range of acceptance in the future.

First, the aim of this project was to develop characterization tools, to analyze the effects of capsule size and of the cell concentration used during encapsulation on the distribution of cells and their amplification. These parameters can then be adapted according to the various projects' objectives.

The second aim was the development of a method for the harvest and freezing of a high production of iPSC in a bioreactor.

Léa
POINÇOT
Classique

DIAGNOSTICA STAGO

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Emilie Frisan

Optimisation du test du fibrinogène dérivé du Taux de Prothrombine

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 14h50 - Jury C

Hémostase, coagulation, diagnostic, Test TP, Fibrinogène dérivé, dosage, calibration, automate, optimisation de test.

Diagnostica Stago est une entreprise de diagnostic in vitro spécialisée dans les domaines de l'hémostase et de la thrombose. Elle produit et commercialise des réactifs et des automates dédiés à l'exploration des différentes voies de la coagulation sanguine.

Il a été question dans ce stage, d'étudier l'application d'un réactif du type thromboplastine, classiquement utilisé pour l'étude de la voie dite extrinsèque de la coagulation (taux de prothrombine (TP) et dosage des facteurs de la coagulation exogènes}, pour le dosage du fibrinogène par la méthode du fibrinogène dérivé du test du taux de prothrombine.

Le fibrinogène est une protéine jouant un rôle clé dans la coagulation plasmatique. Le test du fibrinogène dérivé est une méthode d'estimation indirecte du taux de fibrinogène qui repose sur la variation de la densité optique lors de la formation du caillot au cours d'un test de taux de prothrombine réalisé sur automate. Les mesures de ADO sont ensuite converties en taux de fibrinogène par le biais d'une droite de calibration. Cette méthode présente l'avantage de donner au client deux informations en un seul test ; le taux de prothrombine et le taux de fibrinogène. Le premier objectif du stage a été de consolider la méthode de calibration du dosage du fibrinogène par le réactif, tâche la plus complexe effectuée du fait d'une différence de comportement entre les calibrants utilisés et les plasmas de patients, En parallèle, la méthodologie de réalisation du test sur automate a été optimisée et les différentes performances analytiques de la méthode ont été évaluées.

GENNEVILLIERS • FRANCE

3/3/2021 → 9/2/2021

Optimization of the prothrombin-derived fibrinogen

Détruit après soutenance

Hemostasis* coagulation, diagnostic, PT test, PT-derived fibrinogen, dosage* calibration, automate, test optimization

Diagnostica Stago is an in vitro diagnostic company specialized in the fields of hemostasis and thrombosis. It produces and markets reagents and automated systems dedicated to the exploration of the various pathways of blood coagulation.

The internship consisted in the study of the application of a thromboplastin reagent, usually used for the study of the extrinsic pathway of coagulation (prothrombin time (PT) and dosage of exogenous coagulation factors} for the determination of fibrinogen level by the PT-derived fibrinogen method. Fibrinogen is a protein playing a key role in plasma coagulation. The PT-derived fibrinogen method is an indirect method of estimating of fibrinogen based on the shift in optical density during clot formation with a prothrombin test performed on an instrument. The ADO measurements are then converted into fibrinogen levels using a calibration line. This method has the advantage of giving to the client two pieces of information in one test: the prothrombin time and the fibrinogen level. The first objective was to consolidate the method of calibration of the fibrinogen assay by the reagent, which was the most complex task to perform due to a difference in behavior between the calibrators used and the patient plasmas. At the same time, the test methodology used on the automated system has been optimized and the different analytical performances of the method have been evaluated.

Wilson
RIPPON
Classique

ICHNOS SCIENCES SA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Romain METTE

Optimisation d'une plateforme de clarification de culture cellulaire

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 09h15 - Jury C

Clarification, filtration en profondeur, optimisation, développement de procédé

La clarification est une étape clé au sein d'un procédé de production de biomolécules. Cette étape est située à l'interface entre l'USP et le DSP. Au sein d'Ichnos, elle correspond à la dernière étape de l'USP. La clarification permet d'éliminer les particules de large taille telles que les cellules entières ou les débris cellulaires à la fin de la culture cellulaire dans le but de préparer les étapes suivantes axées sur l'élimination des impuretés de plus petites tailles.

Afin de pallier la complexité croissante des biomolécules et des procédés de culture cellulaires associés, diverses membranes ont été développées pour la filtration en profondeur. Cependant, la compatibilité de ces nouveaux modèles avec le produit d'intérêt doit être évaluée. Au sein d'Ichnos, de nombreux défis en termes de récupération de produit sont apparus. Une hypothèse qui pourrait expliquer de faible rendement en produit serait son adsorption sur la matrice du filtre en profondeur.

Par conséquent, l'objectif de ce stage était d'optimiser la plateforme de clarification actuelle afin de maximiser le rendement en produit à cette étape. Le stage a été divisé en 2 parties. Le premier axe consistait à optimiser le rendement en ciblant des paramètres du procédé tels que le débit, la surface et les tampons de lavage. L'évaluation de l'impact de ces différents paramètres a permis de mettre en évidence deux potentielles améliorations. Un changement dans le tampon de lavage a augmenté en moyenne le rendement en titre de 14 %. Des filtres cellulose ont également systématiquement conduit à des rendements en titre 20 % plus élevés à ce qui est habituellement récupéré avec les filtres synthétiques de la plateforme actuelle.

La deuxième partie était axée sur la recherche d'alternatives à la plateforme actuelle pour développer un nouveau procédé de clarification. Les filtres en profondeurs de différents fournisseurs ont été évalués et comparés à la plateforme actuelle. Une technologie combinant la filtration tangentielle et la filtration en profondeur a été testée comme une potentielle alternative à la filtration en profondeur. Finalement, des technologies combinant l'étape de clarification à celle de chromatographie protéine A, ont aussi été testées. Globalement, aucune des alternatives évaluées n'a montré une performance suffisante pour être implémentée au sein d'Ichnos Sciences.

LA CHAUX-DE-FONDS • SUISSE

4/1/2021 → 9/30/2021

Optimization of a cell culture clarification platform

Détruit après soutenance

Clarification, depth filtration, process development, optimization

Clarification is a key step during the manufacturing of a biopharmaceutical molecule. This process step is located at the interface between the upstream and the downstream process. At Ichnos, this step is located in the USP team. Clarification allows to remove large and medium size particles like whole cells and cell debris from the cell culture fluid at the end of the bioreactor process in order to prepare the subsequent chromatography steps focused on the removal of smaller impurities.

In order to address the increasing complexity of biological molecules and the associated upstream processes, various membrane materials have been developed for depth filtration. However, compatibility of such new membrane designs and the specific product need to be evaluated. At Ichnos, product yield challenges have been observed post-clarification. One hypothesis that could explain low product yields would be the adsorption of the product on the filter media.

Consequently, the aim of this internship was to optimize the current clarification platform to maximize the product yield. The scope of the internship was divided into 2 main streams. The main one was focused on optimizing the product yield by optimizing platform parameters (flow, surface, equilibration and recovery buffers...). This screening allowed to identify two process improvements to enhance product recovery. First, a change in the recovery flush improved the product recovery by 14 % in average. Then, high cellulosic filters allowed to recover 20 % more than what was recovered with the synthetic filters of the current platform process.

The second stream consisted in screening for alternative technologies to build a new clarification process. Several depth filters from different suppliers were assessed as a potential alternative to current depth filters. Tangential flow-depth filtration technology was tested and compared to the current depth filtration platform. Technologies combining clarification and protein A were also tested. Overall, none of the alternatives tested showed sufficient performance in terms of throughput and product recovery to be implemented as a back-up platform.

Clara
RODRIGUEZ
RODRIGUEZ

CBI

APHEA BIO

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Steven VANDENABEELE

Sélections et investigations de consortium entre bactéries et champignons pour améliorer leur activité biostimulante pour les plants de blé.

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 14h00 - Jury A

Biostimulant — Blé - Colonisation in vitro - Consortium entre bactéries et champignons - Microorganismes stimulateurs de la croissance des plantes - Minéralisation du phytate - Production de sidérophores

Le projet Européen Green Deal vise à réduire l'ensemble des engrais d'au moins 20% d'ici 2030, c'est pourquoi Aphea.Bio développe des produits agricoles biologiques à base de microorganismes tels que des biostimulants, qui pourraient contribuer à réduire l'utilisation d'engrais tout en maintenant les rendements.

Un total de 10 champignons et 10 bactéries de la collection d'Aphea.Bio ayant été testés individuellement in planta et prouvés une amélioration de la croissance de la plante constitue le point de départ de cette étude. En associant ces microorganismes et en explorant leur potentiel métabolique, des consortiums microbiens prometteurs ont été identifiés avec des effets additifs ou synergiques pour la plante. 1) Une large série de consortiums (100) a été testée pour leur capacité à améliorer la croissance fongique : 18 combinaisons ont été sélectionnées, et 5 d'entre elles ont été confirmées. 2) D'autre part, les combinaisons ont été choisies pour leurs attributs favorisant la croissance des plantes tels que la production de sidérophores et la minéralisation du phytate. Ces caractéristiques sont responsables respectivement de la chélation du fer et de la biodisponibilité du phosphate pour la plante. Deux champignons et 2 bactéries ont démontré une minéralisation du phosphate tandis que 6 champignons et 3 bactéries ont produit des sidérophores. 3) De plus, 5 bactéries ont montré une aptitude à explorer leur environnement, essentielle pour accéder aux racines et créer des synergies stables entre plantes et microbes. 4) Pour finir, des expériences de colonisation in vitro ont permis d'observer au microscope optique les interactions physiques entre les hyphes fongiques et les bactéries pour 8 consortiums prometteurs. À partir de toutes les expériences réalisées, cette étude mène à une sélection de deux consortiums bactériens-fongiques les plus prometteurs, qui feront l'objet d'une étude plus approfondie in planta en serre pour leurs effets biostimulants.

ZWIJNAARDE • BELGIQUE

3/8/2021 → 9/8/2021

Selecting and investigating bacteria-fungi consortia to boost their biostimulant activity in wheat.

Détruit après soutenance

Bacteria-Fungi (B-F) consortia - Biostimulant - in vitro colonization - Plant-growth promoting bacteria (PGPB) - Plant-growth promoting fungi (PGPF) — Phytate mineralization - Siderophore production - Wheat

The European Green Deal aims to reduce overall fertilizer use by at least 20% by 2030. Accordingly, Aphea.Bio develops biological-based agricultural products such as biostimulants, based on microorganisms, that help in reducing fertilizer applications while maintaining yields.

A total of 10 bacteria (B) and 10 fungi (F) from the Aphea.Bio collection that were previously tested in planta as single strains and proven to have plant-growth promoting (PGP) activity (biostimulant), formed the starting point of this project. By pairing these bacteria and fungi and exploring their metabolic potential, promising microbial consortia were identified with additive or synergistic effects for the plant. 1) A large series of B-F consortia were screened for their capability of boosting the total fungal biomass : 18 promising combinations were selected and 5 of them were confirmed. 2) On the other hand, consortia were chosen for their PGP traits such as siderophore production and phytate mineralization. These traits are responsible for respectively chelating iron and transforming insoluble forms of phosphate in available P compound for the crop. Two PGPB and two PGPF mineralized the phytate, and 6 fungi and 3 bacteria produced siderophores. 3) Additionally, the capacity of bacteria to explore their environment was evaluated : 5 of them were motile, which is essential to reach roots and create stable plant-microbial synergies. 4) Finally, for 8 promising B-F combinations, in vitro colonization experiments demonstrated physical interaction between fungal hyphae and bacteria by optical microscopy. Based on all the experiments performed, this study leads to a selection of two promising B-F consortia that will be further in depth investigated via in planta tests in the greenhouse for their boosted plant-growth promoting effects.

Juliette
SAFFROY

Classique

DDS ALLIANCE SA

LAUSANNE • SUISSE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Daniel DOS SANTOS

3/29/2021 → 9/10/2021

Ingénieur(e) Marketing

Marketing Engineer

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

vendredi 8 octobre - 14h50 - Jury B

Marketing, Agroforesterie, Paulownia, Agriculture biologique, Stratégie, Site internet, Logo, Vidéo publicitaire, Gestion de projet, Jira

Marketing, Agroforestry, Paulownia, Organic farming, Strategy, Website, Logo, Advertising video, Project management, Jira

Marie-Anne
SANGLARD

Classique

La crise environnementale qui sévit actuellement intensifie le réchauffement climatique et augmente la vulnérabilité de certaines populations, notamment les agriculteurs. C'est en prenant conscience de ces événements et avec la volonté de créer une économie circulaire que Treesion a vu le jour. En effet, Treesion permet à tous d'apporter sa pierre à l'édifice dans la lutte climatique à travers ses contrats d'investissement écologique, tout en soutenant les agriculteurs et obtenant un avantage financier. L'entreprise travaille avec un modèle d'agroforesterie impliquant des arbres appelés Paulownias, particulièrement intéressants d'un point de vue écologique et financier. Les agriculteurs sont de plus accompagnés dans leur transition vers l'agriculture biologique à travers un service de consulting agricole gratuit.

The current environmental crisis is intensifying global warming and increasing the vulnerability of certain populations, in particular farmers. It was by becoming aware of these events and with the desire to create a circular economy that Treesion was born. Indeed Treesion allows everyone to make a contribution to the climate fight through its green investment contracts, while supporting farmers and obtaining a financial advantage. The company works with an agroforestry model involving trees called Paulownias, which are particularly interesting from an ecological and financial point of view. Farmers are also supported in their transition to organic farming through a free agricultural consulting service.

J'ai participé à ce projet en tant que stagiaire consultante pour la DDS Alliance afin d'être impliquée dans l'établissement de la stratégie de marketing digital de cette start-up. J'ai ainsi été en charge de la création du nom et du logo de l'entreprise, devant refléter au mieux sa mission. J'ai été impliquée dans l'élaboration de l'ensemble de la stratégie de communication à travers le site internet et les réseaux sociaux, le public cible, le message clé ainsi que le planning de lancement de ces différents canaux. J'ai créé le site web : son contenu, son design et son graphisme en prenant en compte le futur développement de l'entreprise. J'ai réalisé une vidéo d'interview de partenaires de l'entreprise pour les Paulownias. Enfin, j'ai rédigé un cahier des charges et démarché une entreprise pour la réalisation d'une vidéo publicitaire expliquant les investissements écologiques que Treesion propose. Cette dernière est créée afin de toucher le plus grand nombre de personnes voulant placer son argent et de servir de support pour la campagne de crowdfunding.

I was involved in this project as a consultant intern from the DDS Alliance in order to participate in the establishment of the digital marketing strategy of this start-up. I was thus in charge of the creation of the name and the logo of the company, to best reflect its mission. I participated in the development of the entire communication strategy through the website and social networks, the target audience, the key message as well as the launch schedule for these different channels. I created the website: its content, design and graphics while thinking about the future development of the company. I made a video interview of a corporate partner for the Paulownias. Finally, I wrote specification requirements and approached a company for the production of an advertising video explaining the ecological investments that Treesion offers, in order to reach the greatest number of investors and to use as a support for the crowdfunding campaign.

Tout au long de ce projet de fin d'études j'ai utilisé des outils de gestion de projet dont Jira et un espace Google Drive. J'ai de plus collaboré avec les différentes équipes de Treesion tout en développant le réseau de communication interne de l'entreprise à l'aide de supports comme les power points et les minutes meeting.

Throughout this graduation project I used project management tools including Jira and a Google Drive space. I also collaborated with the various Treesion teams while developing the company's internal communication network using media such as power points and minutes meetings.

GENZYME POLYCLONALS SAS

LYON • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Christine BENDAHOU

3/8/2021 → 9/3/2021

Spécificité des Immunoglobulines de lapin anti-lymphocytaires par Western Blot 2D

: Spécificité des Immunoglobulines de lapin anti-lymphocytaires par Western Blot 2D

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

Détruit après soutenance

vendredi 8 octobre - 10h05 - Jury C

Développement de méthode analytique ; Caractérisation de biomolécules, Western blot 2D ; Immunologie ; SDS-PAGE

Développement de méthode analytique ; Caractérisation de biomolécules, Western blot 2D ; Immunologie ; SDS-PAGE

Sanofi Genzyme fabrique un médicament immunosuppresseur d'origine biologique dont le principe actif est une solution polyclonale d'anticorps de lapin anti-thymocytes humains. Afin de moderniser et sécuriser son outil de production, Sanofi Genzyme souhaite apporter des modifications à son procédé de purification. Avant que ces modifications puissent être implémentées, il est nécessaire de montrer aux autorités de santé que le produit issu du procédé actuel et celui issu du nouveau procédé ont des caractéristiques biologiques comparables. Le produit contient des anticorps spécifiques d'un grand nombre de déterminants antigéniques présents sur les lymphocytes T humains. Dans le cadre de ce projet, j'ai développé une méthode de Western Blot en deux dimensions permettant de montrer que les protéines thymocytaires reconnues par ce sérum anti-lymphocytaire sont identiques quel que soit le procédé de purification. La première étape consiste à développer la méthode en elle-même et optimiser les paramètres critiques des étapes d'isoélectrofocalisation, de SDS-PAGE, de transfert sur membrane et d'immunodétection. Dans un second temps un profil type (empreinte) est déterminé et une évaluation des performances de la méthode est réalisée. Il est ainsi possible de comparer cette empreinte de référence avec les profils obtenus en utilisant des échantillons issus du nouveau procédé de production.

Sanofi Genzyme manufactures an immunosuppressive drug of biological origin which contains polyclonal rabbit antibodies targeting human thymocyte cells. To modernize and secure its production tool, Sanofi wants to realize some manufacturing process changes. These modifications required the authorization of health authorities, who need evidence showing that there is no difference of biological activities between the product obtained by the new process and the product obtained by the current process. Demonstrating the comparability of the product regarding antibodies specificities is one of the main features to consider. As part of the project, I had to develop a Western Blot method using two dimensions, to show that the proteins targeted by our immunosuppressive drug are the same even if the process used is different. The first step consisted in developing the technique of Western Blot in two dimensions and optimizing several parameters of the isoelectric focusing, SDS-PAGE, transfer of proteins on a membrane and immunodetection. Then, a reference profile of specific of this anti-lymphocyte serum is determined, and performance and variability of the method were assessed. Finally, this reference profile will be used to be compared with the profile obtained with samples issued from the new process.

Benoît
SEPARI
Classique

IDEXX MONTPELLIER SAS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Romain HUGUET

Optimisation d'un procédé de purification d'anticorps monoclonaux par FPLC pour le diagnostic vétérinaire

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 11h10 - Jury D

Anticorps monoclonaux ; Purification Optimisation ; Diagnostic vétérinaire ; FPLC ; Culture cellulaire ; ELISA

Anciennement Institut Pourquier, le site d'IDEXX Montpellier SAS, employant une cinquantaine de personnes, est spécialisé dans la production de kits de diagnostic vétérinaire, par ELISA ou PCR. De ce fait, les réactifs et matières premières utilisés sont produits majoritairement sur site, notamment pour les kits ELISA.

La production des anticorps monoclonaux est assurée par le Technical Manufacturing Service (TMS) d'IDEXX Montpellier SAS. Ces anticorps sont produits en différents bioréacteurs. Une fois la culture terminée, les surnageants sont traités et clarifiés avant d'être purifiés sur colonne de chromatographie d'affinité sur protéine A. Les anticorps monoclonaux — des Immunoglobulines G (IgG) — sont ensuite couplés à la peroxydase de Raifort (Horseradish peroxidase, HRP) et validés en ELISA. L'ensemble de ce procédé évolue au fil des ans, avec, par exemple, le Upstream Process qui a évolué de la production en ascites vers une production dans un bioréacteur qui lui-même est voué à être remplacé par un nouveau. L'étape de purification des anticorps, quant à elle, a peu évolué. Cette étape a été conçue pour développer un procédé général et unique pour tous les anticorps produits afin de faciliter le Downstream Process (DSP). Néanmoins, différentes sous-classes d'IgG sont produites par le TMS et la littérature révèle que ces sous-classes ont des interactions différentes avec la protéine A et ont des conditions de purification propres à chaque sous-classe. Un travail en amont de ce projet a été effectué et a démontré, entre autres, que ce propos était valable pour les anticorps produits au sein d'IDEXX,

Ce projet de fin d'études sera ainsi concentré sur l'optimisation du DSP déjà en place pour l'anticorps dirigé contre le virus de la langue bleue. Une étape de production en bioréacteur sera effectuée avant l'optimisation et modernisation du procédé de purification, en passant sur des colonnes de chromatographie d'affinité sur protéine A nouvelle génération, dont l'une d'elle offrant la possibilité de faire un cycle de purification en moins de cinq minutes. Ces anticorps ainsi purifiés seront ensuite couplés à la HRP puis validés en ELISA pour s'assurer que la purification permet d'obtenir des anticorps purifiés fonctionnels.

MONTPELLIER • FRANCE

3/8/2021 → 9/8/2021

Optimization of monoclonal antibodies purification process by FPLC method for veterinary diagnostic

Détruit après soutenance

Monoclonal antibodies; Purification; Optimization; Veterinary diagnostic; FPLC; Cell culture; ELISA*

Formerly Pourquier Institute, the Montpellier SAS site, employing around fifty people, is specialized in the veterinary diagnostic kits production such as ELISA or PCR kits. Thus, reagents and raw materials are mostly produced on site, especially for ELISA kits.

Monoclonal antibodies production is ensured by IDEXX Montpellier SAS' Technical Manufacturing Service (TMS). These antibodies are produced in different bioreactors. Prior to the A affinity purification step, supernatants are treated and clarified. Then, monoclonal antibodies — Immunoglobulins G (IgG) — are coupled with the Horseradish Peroxydase (HRP) and validated in ELISA. The overall process has evolved through the years. For instance, the upstream Process has progressed from ascites production to one bioreactor production which is already moving to a new one. In comparison, the antibody purification step did not change as much. This step has been designed to be a general and unique process for all produced antibodies to facilitate the Downstream Process (DSP). Nonetheless, different IgG subclasses are produced by IDEXX's TMS and literature highlights that these subclasses have different interactions with the protein A and have their own purification conditions. Beforehand, a project has been carried out and has demonstrated that this remark is true for some produced antibodies within IDEXX.

This project will be focused on the DSP optimization for the monoclonal antibody directed against the Bluetongue Virus. An antibody production step will be carried out prior to the optimization and modernization of the purification process. The process will be improved by using next generation A affinity columns, one of which allows to run a purification cycle in less than five minutes. Finally, these purified antibodies will be coupled with the HRP and validated in ELISA to be ensured that the purification step allows to obtain functional purified antibodies.

Maxime
TOUJAS

Classique

RD-BIOTECH

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Mathieu KOPEC

Optimisation d'une méthode de production de plasmide en fermenteur

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

vendredi 8 octobre - 14h00 - Jury D

Optimisation, Production, Fermentation, Plasmide, E.coli

Ces dernières années, le plasmide élément génétique extra chromosomique bactérien, est devenu matière première incontournable dans les biotechnologies. Il est à la base de la production biomolécules, l'apport de caractéristiques aux organismes que sont les OGM et des thérapies médicales innovantes que sont les thérapies géniques, cellulaires et à ARN messenger. La demande ce produit est en hausse, il devient nécessaire de produire des plasmides en quantités plus importantes et plus rapidement tout en s'assurant de la qualité du produit. En effet, en thérapie, le plasmide être à la fois matière première mais aussi produit final. Puisqu'il existe différents usages des plasmides, leur pureté doit être adaptée à leur utilisation. Jusqu'à présent les clients de RD-Biotech n'utilisaient pas des quantités industrielles de plasmides et ceux-ci étaient destinés principalement à la recherche ou aux essais cliniques de phase I et II dans le développement de leurs projets. Avec le développement des diverses thérapies et notamment celle à ARN messenger mise en lumière avec la crise du covid-19, il devient urgent pour rester compétitif, d'être capable de fournir aux entreprises qui le souhaitent, des plasmides en grande quantité et qui répondent à des critères de qualité strictes (Bonnes pratiques de fabrication ou Good Manufacturing Practices GMP). Les plasmides produits au sein de l'entreprise doivent désormais, au vu des quantités souhaitées par les clients être produits dans des bioréacteurs. Ainsi l'optimisation de nombreux facteurs doit être prise en compte pour permettre la production plus importante possible dans un temps réduit. La nouvelle équipe de recherche pour la production plasmidique à grande échelle du groupe RD-Biotech avait donc pour but d'optimiser le processus production développé en interne à l'échelle fermenteur de 2L puis de 6 à 30L. Différents facteurs furent étudiés dans l'optique d'améliorer la production tout en gardant une flexibilité suffisante pour pouvoir changer de souche ou de plasmide selon les besoins de la production.

BESANÇON • FRANCE

4/5/2021 → 10/1/2021

Optimisation d'une méthode de production de plasmide en fermenteur

Détruit après soutenance

Optimisation, Production, Fermentation, Plasmide, E.coli

Lately, plasmid has become an essential raw material, not only it can be used to produce biomolecules or generate new characteristics for genetic modified organisms but also for the new generation advanced therapy medicinal products ('IATMPs') such as gene, cells, or RNA based therapies. Demand is soaring and it becomes necessary to produce more plasmid, faster but also to keep the quality the safety of this production. Plasmids can be the starting material but also the final product. As is different function the purity should be adapted. Until recently the customers of RD-Biotech did use industrial quantities of plasmid because they were used for research purpose or in clinical phase or II. However, With the space taken by the new therapies and the highlight of the messenger vaccine With the crisis of covid-19, it has become an emergency to remain one of the suppliers able produce large quantities of pDNA With strict criteria of quality such as GMP. Plasmid should produced in bioreactor to reach the quantity needed by some customers. In this way, the optimisation of numerous factors should be studied to improve the production and the competitiveness. The team the company RD-biotech in charge of process development aims to adapt and optimise the production process already used at the 2 liter scale in bioreactor up to 30L bioreactor. Various factors have studied to be able to increase the production but also keep the flexibility to be able to use different strain or plasmid according to the needs of the customer.

Julien
TOUSSAINT

CBI

UNIVERSITE DE NANTES

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Anne CAMUS

Différenciation de cellules souches pluripotentes induites en cellules progénitrices du disque intervertébral

*Rapport non confidentiel
Soutenance non confidentielle*

vendredi 8 octobre - 14h50 - Jury A

Cellules souches pluripotentes induites humaines, régénération du disque intervertébral, différenciation, cellules notochordales, voies de signalisation, transcriptome

Les cellules notochordales (CNT) sont progénitrices et régulatrices de la structure au cœur du disque intervertébral (DIV). Leur disparition est responsable d'une dégradation irréversible de la matrice extracellulaire du DIV. La différenciation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) en CNT permettrait de mieux comprendre cette maladie et de trouver des solutions thérapeutiques pour inverser la dégénérescence. L'activation de la voie WNT déclenche une transition épithéliomésenchymateuse (EMT) des iPSC qui se différencient en progéniteurs de mésendoderme capables de s'engager vers les lignages endodermiques ou mésodermiques. La transfection de l'ARNm NOTO permet la spécification des progéniteurs en mésoderme axial puis en CNT.

Une hétérogénéité cellulaire est observée en fin de différenciation. Nous faisons l'hypothèse qu'elle est délétère pour la survie des CNT. La purification des CNT des populations contaminantes n'est pas possible sans marqueur de surface spécifique du lignage notochordal. Ce projet consistait à comprendre l'origine de cette hétérogénéité et à définir une stratégie pour la réduire afin de favoriser l'émergence des CNT.

Nous avons montré qu'une densité d'ensemencement moyenne des iPSC favorise l'émergence du mésoderme. Par ailleurs, l'inhibition de la voie de signalisation NODAL/TGF- β par l'ajout de SB431542, montre que cette voie est nécessaire à l'EMT. Cependant, si cette inhibition est mise en place après l'EMT, elle permet d'augmenter l'engagement des progéniteurs de mésendoderme vers le lignage notochordal. Enfin, l'ajout d'un anticorps anti-VEGF diminue l'expression de marqueurs des cellules endothéliales non souhaitées. Des travaux complémentaires devront valider un effet significatif sur la survie des CNT de cette dernière stratégie. Pour finir, l'analyse du transcriptome sur cellules uniques permettra l'identification des différents types cellulaires présents à l'issue de la différenciation et de nouveaux marqueurs de CNT.

NANTES • FRANCE

1/4/2021 → 7/4/2021

Differentiation of induced pluripotent stem cells into intervertebral disc progenitor cells

Remis à NT. Conservé pendant 3 ans

Human induced pluripotent stem cells, intervertebral disc regeneration, differentiation, notochordal cells, signalling pathway, transcriptome

Notochordal cells (NLCs) are progenitors and regulators of the core of the intervertebral disc (IVD). Their disappearance leads to an irreversible degradation of the extracellular matrix of the IVD. Differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSC) into NLCs would allow us to better understand the disease and to find therapeutic solutions to reverse the degeneration. Activation of the WNT pathway triggers an epithelial-mesenchymal transition (EMT) of iPSCs that differentiate into mesendodermal progenitors with the potency to commit to endoderm or mesoderm lineages. Transfection of NOTO mRNA into these progenitors allows specification of the axial mesoderm and the emergence of CNTs.

Cellular heterogeneity is observed at the end of the differentiation. We hypothesize that heterogeneity and the presence of endothelial cells would be deleterious to the survival of NLC. To date, no surface marker specific of the notochordal lineage is known to purify NLC from unwanted populations. This project was about understanding the origin of this heterogeneity to define a strategy to reduce it and promote the emergence of a larger number of NLC.

We showed that lowering iPSCs seeding density favors the emergence of mesoderm. Next, we focused on the effect of inhibiting the Nodal/TGF- β signaling pathway to block the differentiation into endodermal derivatives. Our results show that the TGF- β pathway is required for EMT, but that addition of the inhibitor SB431542 following the process of EMT, promotes the commitment of the mesendodermal progenitors to the notochordal lineage. Finally, the addition of an anti-VEGF antibody demonstrated a decrease in the expression of specific endothelial cell markers. Further work is needed to show a significant effect on NLC survival. Finally, a transcriptome analysis experiment on single cells will allow the identification of the different cell types generated at the end of differentiation and of novel NLC-specific markers.

Julie
WARIN

Mobilité

DEEP BRANCH BIOTECHNOLOGY LTD

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Ivo KRETZERS

Design du procédé downstream après fermentation gazeuse pour la production de protéines unicellulaires

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 10h05 - Jury C

Microfiltration, centrifugation, séchage, fermentation, CO₂, protéine, nourriture pour animaux, DSP

L'un des plus grands défis du XXI^e siècle est de répondre à la demande de protéines due à la croissance démographique tout en atteignant l'objectif de zéro émission nette de CO₂ d'ici 2050. Le nombre d'humains devrait doubler, et l'élevage industriel ainsi que la pêche qui fournissent la nourriture sont responsables d'une part importante des émissions de CO₂. Fondée en 2018 par Robert Mansfield, Peter Rowe et Bart Pander, Deep Branch Biotechnology a développé un procédé permettant de recycler les gaz résiduels en protéines, utilisées comme ingrédient dans les aliments pour animaux. Cette technologie est basée sur un processus de fermentation gazeuse, utilisant le CO₂ et le H₂ comme source de carbone et d'énergie pour produire une protéine unicellulaire appelée Proton™. L'empreinte carbone de Proton est jusqu'à 90 % inférieure à celle des sources de protéines traditionnelles de l'alimentation animale. En 2021, Deep Branch a construit sa première usine pilote aux Pays-Bas avec pour objectif le scale-up du procédé de l'échelle laboratoire à pilote et de réaliser des essais sur les animaux. Le scale-up d'un processus de fermentation peut poser un certain nombre de défis en raison de la variabilité des conditions physiologiques dans des grands réacteurs et du métabolisme complexe des micro-organismes. Les principaux objectifs de ce projet étaient axés sur le design du procédé downstream pour le procédé de fermentation gazeuse de Deep Branch. Ce projet est passé par plusieurs étapes dont le design conceptuel du procédé ainsi que la recherche et l'analyse d'informations concernant les technologies tout en gardant à l'esprit la faisabilité industrielle. En effet, l'eau et les autres composants doivent être retirés du bouillon de fermentation, et plusieurs techniques peuvent être utilisées telles que la microfiltration et la centrifugation. Une fois la technologie choisie, en fonction de la faisabilité commerciale, la dernière étape a consisté à produire des dessins techniques afin de visualiser le processus.

LEIDEN • PAYS-BAS

4/1/2021 → 10/1/2021

Downstream processing design following gas fermentation for the production of single-cell proteins

Détruit après soutenance

Microfiltration, centrifugation, drying, fermentation, CO₂, protein, animal feed, DSP

One of the biggest challenges of the 21st century is to meet the protein demand due to population growth while achieving zero net carbon dioxide emissions target by 2050. The number of humans is expected to double, and industrial animal farming as well as fishing that provide food are responsible for a significant proportion of CO₂ emissions. Founded in 2018 by Robert Mansfield, Peter Rowe and Bart Pander, Deep Branch Biotechnology has developed a process allowing to recycle waste gas into protein, which is used as an ingredient for compound animal feeds. This technology is based on a gas fermentation process, using CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy to produce a single-cell protein called Proton™. The carbon footprint of Proton is up to 90 % lower than that of traditional animal feed protein sources. In 2021, Deep Branch built its first pilot plant in the Netherlands with the objective to scale up the process from laboratory to pilot scale and to conduct trials with animals. Scaling up a fermentation process can pose a number of challenges due to variability of physiological conditions present within larger reactor vessels and the complex metabolism of microorganisms. The primary objectives of this project centered around the design of downstream processing for the Deep Branch gas-fermentation process. This project went through several steps including conceptual design of the process as well as research and analysis of information with regards to different technologies while keeping in mind the industrial feasibility. Indeed, water and other components must be removed from the fermentation broth, and several techniques can be used such as microfiltration and centrifugation. Once the technology was selected, based on commercial feasibility, the last step was to produce technical drawings in order to visualize the process.

Magali
WISSLER

Classique

FRESENIUS KABI SwissBioSim Gmbh

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Simon FRADIN

Évaluation de technologies de comptage de cellules en suspension pour le suivi de la production d'anticorps monoclonaux

Rapport confidentiel
Soutenance confidentielle

jeudi 7 octobre - 16h05 - Jury D

Culture cellulaire CHO, Suivi et contrôle des procédés, Densité cellulaire viable, Viabilité cellulaire, Méthode au bleu trypan, Diffraction de la lumière, Permittivité/Capacitance

Les lignées CHO sont largement utilisées pour les processus de bio production dans l'industrie pharmaceutique. Pour suivre la culture cellulaire, la densité cellulaire et la viabilité des cellules sont utilisées comme facteurs clés,

Le bleu trypan est la méthode la plus courante pour quantifier la viabilité et la concentration cellulaire dans de nombreux laboratoires biologiques, y compris Fresenius Kabi qui la considère comme technologie de référence. Cependant, cette technologie peut présenter des limitations telles qu'une fréquence d'analyse limitée et des dangers de toxicité liés aux réactifs utilisés. Par conséquent, cette étude porte sur l'évaluation de technologies alternatives à la méthode de référence. L'évaluation des technologies a porté sur l'efficacité de comptage selon des conditions variées (e.g. différents niveaux de concentration cellulaire, plusieurs procédés de cultures cellulaires). Les performances des différentes technologies sont toutes comparées à la technologie de référence.

La première technologie évaluée, basée sur la diffraction de la lumière, s'appuie sur un système d'imagerie sans lentille. Les cellules exposées à une source lumineuse présentent un profil de diffraction de la lumière qui est capturé sous forme de signal. Ce signal est converti et analysé pour quantifier la concentration cellulaire et la viabilité de l'échantillon. Le profil de diffraction de la lumière dépendant de l'état de la cellule, il peut donc être interprété pour extraire des informations sur la culture et aider au développement d'un procédé.

La deuxième technologie évaluée est le principe de mesure de permittivité (ou de capacitance). Les cellules vivantes présentent des différences de permittivité, sous forme de différence de potentiel électrique entre le milieu extérieur et leur cytoplasme. La technologie évaluée s'appuie sur une mesure en continu et en ligne de la permittivité des cellules et cette mesure est utilisée pour quantifier la densité cellulaire viables. Pour cette étude, une sonde est donc intégrée dans le bioréacteur et des signaux de conductivité, permittivité et température sont collectés en temps réel afin de les convertir en mesure de densité cellulaire viable. Un potentiel facteur de correction, ayant un impact sur la mesure de permittivité, a également été étudié lors de cette étude.

EYSINS • SUISSE

3/1/2021 → 8/31/2021

Evaluation of technologies for viability and concentration measurement of CHO cells for monitoring monoclonal antibody production

Détruit après soutenance

CHO cell culture, Process monitoring and control, Viable cell density, Cell viability, Trypan blue method, Lens-free imaging system via CMOS sensor, Capacitance measurement cell counter

CHO cell lines are widely used for bio production processes in the pharmaceutical industry. For monitoring of cell culture, cell density and cell viability are used as key factors.

Trypan blue is the most common method for quantifying cell viability and concentration in many biological laboratories, including Fresenius Kabi as the reference technology. However, this technology may have limitations such as a limited analysis frequency and toxicity hazards associated with the reagents used. Therefore, this study focuses on the evaluation of alternative technologies to the reference method for cell counting. The technology assessment focused on counting efficiency and accuracy under various conditions (e.g. different levels of cell concentration, several cell cultures processes). The performance of the different technologies is all compared to the reference technology.

The first technology evaluated is based on a light diffraction system with lens-less imaging system. Cells exposed to a light source exhibit a light diffraction profile which is captured and converted by a CMOS sensor. This converted signal is analyzed to quantify cell concentration and sample viability. The light diffraction profile depends on the condition of the cell, so this technology could be considered as helpful to extract information about the culture and aid in process development.

The second technology evaluated is the permittivity measurement (or capacitance). Living cells exhibit differences in permittivity, in the form of a difference in electrical potential between the external environment and their cytoplasm. The permittivity measurement technology can produce a continuous, online measurement of the permittivity of cells and this measurement is used to quantify viable cell density. For this study, a sensor is therefore integrated into the bioreactor and conductivity, permittivity and temperature signals are collected in real time in order to convert them into a viable cell density measurement. A potential correction factor, having an impact on the permittivity measurement, was also studied during this study.