

L'OREAL

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Noémie DE CROZE

Optimisation des modèles embryons de poisson pour les tests de toxicité

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Méthodes alternatives, Tests de toxicité, Evaluation environnementale, Embryon de poissons, Evaluation de sécurité humaine

Les produits cosmétiques sont aujourd'hui largement utilisés par la population. L'industrie cosmétique se doit donc d'évaluer la sécurité de ces produits avant leur commercialisation que ce soit envers ses consommateurs ou pour répondre aux nouvelles problématiques environnementales.

La plupart des produits cosmétiques sont, à terme, rincés et sont donc rejetés dans les égouts. Par conséquent, les eaux de surface et eaux côtières peuvent être exposées aux produits chimiques contenus dans les cosmétiques. L'évaluation de l'écotoxicité des cosmétiques et de leurs ingrédients nécessite donc d'étudier leur toxicité pour des organismes représentatifs de la chaîne alimentaire aquatique.

La réglementation européenne interdisant désormais tout tests sur animaux de laboratoire pour les industries cosmétiques, des modèles alternatifs sont désormais mis en place au laboratoire. Les embryons de poissons entrent dans la réglementation européenne et ne sont pas considérés comme animaux utilisés à des fins scientifiques.

Le modèle d'embryon de poisson présente aussi l'atout de pouvoir être utilisé en prédiction pour évaluer des effets toxiques sur l'Homme et notamment la tératogénicité ou la toxicité sur le développement.

Dans ce contexte, le modèle de l'embryon de poisson présente un double avantage pour l'industrie cosmétique. Il est ainsi adapté non seulement à l'évaluation de la toxicité environnementale des produits chimiques mais également un modèle prometteur pour l'évaluation de la tératogénicité des produits chimiques pour l'homme.

L'optimisation d'un test robuste sur ces embryons de poissons pour détecter les substances nocives pour l'environnement et tératogènes pour l'Homme est l'objectif de mon travail d'apprentissage.

Deux espèces d'embryons de poissons, très éloignées phylogénétiquement, ont été considérées : le médaka et le poisson zèbre.

AULNAY-SOUS-BOIS • FRANCE

10/3/2022 → 9/30/2023

Optimization of fish embryo models for toxicity testing

alternative methods, toxicity testing, environmental assessment, fish embryo, human safety assessment

Today, cosmetics are widely used around the world. The cosmetics industry must therefore assess the safety of these products regarding the consumer and environmental issues.

Most cosmetic products are eventually rinsed off and then discharged into the sewage system. As a result, surface and coastal waters can be exposed to the chemicals contained in cosmetics. Assessing the ecotoxicity of cosmetics and their ingredients therefore requires studying their toxicity to aquatic organisms relevant to the aquatic food chain.

As European regulations now ban all laboratory animal testing for the cosmetics industry, alternative models are being developed in the laboratory. Fish embryos are covered by European regulations and are not considered as animals used for scientific purposes.

As a vertebrate, the fish embryo model is also a good candidate to support the prediction of a potential toxic effect on humans, in particular teratogenicity or developmental toxicity, where *in vitro* models are limited.

In this context, the fish embryo model offers a double advantage for the cosmetics industry. It is suitable not only for assessing the environmental toxicity of chemicals, but also for evaluating the teratogenicity of chemicals to humans.

My work aims at the optimization of a robust test on these fish embryos to detect substances potentially harmful to the environment or teratogenic.

To do so two different fish species, phylogenetically distant were studied: the medaka and the zebrafish.

Clémentine  
ALVAREZ

CP

## GENETHON

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Ricardo ROJAS GONZALEZ

Validation de procédé : démonstration de la robustesse du procédé de purification du produit de thérapie génique GNT004 pour la maladie de Duchenne

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Validation, Attributs Qualité Critiques, Paramètres Procédé Critiques, purification/DSP, thérapie génique, plan d'expérience, qPCR

Généthon développe un traitement de thérapie génique pour la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Ce produit est actuellement en essai clinique. En vue d'une demande d'Autorisation de Mise sur la Marché (AMM), un dossier de validation du procédé de production du produit doit être constitué. J'ai donc pour objectif de démontrer la robustesse du procédé de purification.

Une société experte scientifique et réglementaire pour l'industrie pharmaceutique est intervenue en 2021 pour définir, avec les équipes procédés, réglementaires et cliniques, les Attributs Qualité Critiques du produit de thérapie génique pour la Myopathie de Duchenne. La spécification de certains attributs reste à définir. En collaboration avec l'ingénieur formulation/galénique, mon premier objectif est de réaliser une étude de stabilité pH pour définir la gamme de pH de formulation optimale.

Mon second objectif est d'étudier l'impact de la variation des paramètres du procédé de purification sur les Attributs Qualité Critiques du produit final et d'établir un fichier avec les Paramètres Procédé Critiques. La robustesse est démontrée par étape du procédé de purification. Pour chaque paramètre de l'étape, un score de sévérité, d'occurrence et de détectabilité du risque est attribué. Le produit des trois scores, appelé Numéro de Priorité des Risques, permet de classer les paramètres comme critiques ou non. Les scores sont attribués à l'aide de la littérature et de l'historique des études réalisées en développement. Après ce travail d'analyse, je mets en place des études complémentaires pour finaliser l'attribution des scores et définir des gammes d'acceptabilité pour chaque paramètre.

Les expériences sont menées suivant l'établissement d'un plan d'expérience (Design of Experiment ou DoE). La validation devrait être réalisée à l'échelle de production clinique mais le prix d'un lot à l'échelle industrielle étant trop important, les essais sont réalisés à l'échelle laboratoire. Chaque essai est réalisé sur l'ensemble du procédé, l'objectif étant d'évaluer l'impact des déviations sur le produit final.

## EVRY-COURCOURONNES • FRANCE

10/1/2022 → 9/30/2023

Process validation: demonstration of robustness of the purification process of the gene therapy product GNT004 for Duchenne disease

Validation, Critical Quality Attribute (CQA), Critical Process Parameter (CPP), purification/DSP, gene therapy, design of experiment, qPCR

A gene therapy product is being developed by Généthon for Duchenne muscular dystrophy (DMD). The product is currently undergoing clinical trial. In a view of a Marketing Authorization Application, a validation file of the production process of the product must be constituted. I therefore aim to demonstrate the robustness of the purification process.

In 2021, a scientific and regulatory specialist company for the pharmaceutical industry came in to define, along with clinical, regulatory, and development teams, the Critical Quality Attributes (CQA) for gene therapy product for Duchenne Myopathy. Specifications for some attributes still need to be established. My first goal is to complete a pH stability study in cooperation with the formulation/galenic engineer to determine the ideal formulation pH range.

My second objective is to study the impact variations of the process parameters on the Critical Quality Attributes (CQA) of the Drug Product and to establish a file with the Critical Process Parameters (CPP). Robustness is demonstrated by step of the purification process. For each step parameter, a risk severity, occurrence and detectability score is assigned. The product of the three scores, called the Risk Priority Number (RPN), is used to classify the parameters as critical or not. Scores are assigned using the literature and the history of development studies. After this analysis work, I set up additional studies to finalize the assignment of scores and define ranges of acceptability for each parameter.

Experiments are conducted according to the establishment of a design of experiment (DoE). The validation should be carried out at the level of clinical manufacturing, but because the cost of a batch on an industrial scale being too high, laboratory-scale testing is done instead. Each test is carried out on the entire process, the objective being to assess the impact of deviations on the Drug Product.

Julie  
AUBERT

CP

**SANOPI PASTEUR**

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Julia DEMELAS

**Etude de l'état intra-cellulaire de la cellule Vero via une approche transcriptomique.**

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

**Culture cellulaire, métabolisme, transcriptomique, modélisation**

Le sujet de mon contrat de professionnalisation vise à approfondir la connaissance de l'état intra- cellulaire de la lignée cellulaire Vero via une nouvelle approche transcriptomique.

La meilleure compréhension de l'état-intracellulaire permettra de mieux comprendre l'impact des paramètres de culture pour pouvoir mesurer l'impact de certaines dérives lors de la production industrielle et d'avoir des modèles complets et prédictifs pour faire de la transposition d'échelle.

L'intérêt et la difficulté de ce sujet résident dans sa pluridisciplinarité et la mobilisation de compétences allant de la biologie cellulaire et moléculaire à la bio-informatique. Le projet a débuté par le choix des protocoles et des plans d'expériences, suivi de la réalisation des essais et de l'analyse des résultats.

Julie  
AUGER

CP

**MARCY L'ETOILE • FRANCE**

10/3/2022 → 9/29/2023

**Study of the intracellular state of the Vero cell using a transcriptomic approach.**

**Cell culture, metabolism, transcriptomics, modelling**

The aim of my work-study project is to gain a better understanding of the intra-cellular state of the Vero cell line using a new transcriptomic approach.

A better understanding of the intracellular state will enable us to gain a better understanding of the impact of culture parameters so that we can measure the impact of certain drifts during industrial production and to have complete and predictive models for scaling up.

The interest and the difficulty of this subject lie in its multidisciplinary nature and the mobilisation of skills ranging from cellular and molecular biology to bioinformatics. The project began with the choice of protocols and experimental designs, followed by the performance of trials and the analysis of results.

## GENZYME POLYCLONALS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Mathis CAILLOT GALLOIS

### Standardisation des montages à usage unique

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Single-Use Technologies – Transfer Set – Standardisation – Fournisseurs/Sous-traitants /USP-DSP- Thérapie Génique- Vecteurs viraux - rAAV - Lots cliniques

L'unité de production de vecteurs viraux de Sanofi Gerland, développe des médicaments de thérapie génique in vivo dans le cadre d'essais clinique de phases I/II sur des patients ayant des maladies génétiques rares. La plateforme réalise l'upstream ainsi que le downstream process jusqu'à l'obtention de la Drug Substance. Ce service ainsi construit, constitue un pivot entre les phases de recherche puis de développement du procédé réalisé à Sanofi R&D (Genomic Medicine Unit) à Boston et les essais cliniques de phase III. L'objectif est de transférer rapidement de nouveaux procédés de production des différents produits de thérapie génique accélérant l'accès des traitements aux patients. L'une des stratégies pour augmenter son agilité de transfert de production est l'utilisation de la technologie de l'usage unique comprenant les montages. Cependant, les montages utilisés ont été conçus pour être spécifiques au procédé en cours. Entre complexité de leur construction et utilisation de différents consommables et matériaux, ils sont difficilement adaptables à de nouveaux procédés et de nouveaux montages doivent être alors conceptualisés pour répondre au besoin de transfert. Le cadre de ce stage s'intéresse alors à un usage de montages plus standard et à la sous-traitance de leur fabrication, une activité qui est actuellement assurée par les techniciens. Cette démarche implique d'étudier la faisabilité terrain d'une standardisation des montages dont le but est de figer la conception de certains montages avec les équipements durant les étapes du procédé quel que soit le produit. Un état des lieux sur la mise en place de ce changement a été entrepris prenant en compte les services impliqués. Enfin, certains sous-traitants ont été identifiés comme pouvant répondre à ce besoin. Cette stratégie d'utilisation des montages standards et la sous-traitance de leur fabrication a mis en évidence certaines limites discutables.

LYON • FRANCE

3/27/2023 → 9/22/2023

### Standardisation of single-use assemblies

Single-Use Technologies - Transfer Set - Standardisation - Suppliers/Subcontractors /USP-DSP- Gene Therapy- Viral vectors - rAAV - Clinical batches

Sanofi Gerland's viral vector production unit develops in vivo gene therapy drugs as part of phase I/II clinical trials on patients with rare genetic diseases. The platform carries out the upstream and downstream processes to obtain the Drug Substance. This department forms a crucial link between the research and process development phases carried out at Sanofi R&D (Genomic Medicine Unit) in Boston and the phase III of the clinical trials. The aim is to provide a fast transfer of new production processes for the various gene therapy products, accelerating access to treatments for patients. One of the strategies to increase its agility in transferring production is the use of single-use technology including assemblies. The transfer-set used have been designed to be specific to the process underway. Because of the complexity of their construction and the use of different consumables and materials, they are difficult to adapt to other processes and new fixtures have to be designed to match the transfer requirements. The focus of this work placement is on using more standard assemblies and manufacturing them by sub-contract, which is currently done by the technicians

This approach involves investigating the feasibility in the field of standardising assemblies, the object of which is to freeze the design of certain assemblies with the equipment during the various stages of the process, whatever the product.

A report on the implementation of this change was undertaken, taking into account the departments involved. Finally, certain suppliers were identified as being able to meet this need. This strategy of using standard assemblies and subcontracting their manufacture has revealed certain questionable limits.

Cyrine  
BEDJAOUI

Classique

## NEOPLANTS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Alex MERCIER

Ingénierie génétique d'une souche de *Pseudomonas putida* pour la dépollution de l'air intérieur du formaldéhyde

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Bioremédiation, Transformation, Formaldéhyde, Clonage, *Pseudomonas*

En partant du constat que l'air présent à l'intérieur des bâtiments est en moyenne 2 à 5 fois plus pollué que l'air extérieur, Neoplants cherche à développer une solution naturelle : une plante dépolluante issue de la bio-ingénierie. Comme la plupart des organismes vivants, les plantes s'associent avec des microorganismes pour obtenir différents avantages, incluant l'amélioration de leur croissance, de leur résistance au stress et aux maladies, ou de l'absorption des nutriments. À Neoplants, le microbiome de la plante est optimisé pour l'assister et augmenter les capacités de dépollution.

Ce projet de bioremédiation est centré autour d'un composé organique volatil majeur, le formaldéhyde. Neoplants a sélectionné une souche de *Pseudomonas putida* naturellement capable de métaboliser le benzène, xylène et toluène, un des objectifs du stage est d'obtenir par biologie synthétique qu'elle dégrade aussi le formaldéhyde. Plus largement, il s'agissait également de mettre au point une boîte à outils de biologie moléculaire ainsi que des protocoles de transformation et d'édition génomique adaptés à cette souche, afin de pouvoir lui conférer dans le futur des capacités de dépollution supplémentaires.

Lou  
BERNARD

Mobilité

SAINT-OUEN • FRANCE

3/1/2023 → 8/31/2023

Bioremediation, Transformation, Formaldehyde, Cloning, *Pseudomonas*

Based on the observation that indoor air is on average 2 to 5 times more polluted than outdoor air, Neoplants is seeking to develop a natural solution: a bioengineered depolluting plant. Like most living organisms, plants associate with microorganisms to obtain various advantages, including growth promotion, stress and disease resistance, better nutrient absorption. At Neoplants, the plant's microbiome is optimized to assist and increase depollution rates. This bioremediation project focuses on one major volatile organic compound: formaldehyde. Over the years, Neoplants has selected a strain of *Pseudomonas putida* that is naturally capable of metabolizing benzene, xylene and toluene, and one of the aims of this internship is to use synthetic biology to allow it to degrade formaldehyde. More broadly, the goal was also to develop a molecular biology toolbox as well as transformation and genome-editing protocols adapted to this strain, to be able to confer additional depollution capacities in the future.

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

VITRY SUR SEINE • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Hélène ERASIMUS

2/13/2023 → 8/11/2023

Optimisation d'une approche combinant la microfluidique en goutte et le séquençage nouvelle génération pour l'exploration de répertoires de chaînes lourdes et légères d'anticorps nativement pairées

Optimization of an approach combining droplet microfluidics and next-generation sequencing for the deep mining natively paired antibody heavy and light chains repertoires

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Optimisation, microfluidique en goutte, biologie moléculaire, cellules B, anticorps, séquençage à haut débit

Therapeutic antibodies are more and more used in the treatment of diseases. This growth requires the development of increasingly innovative antibody screening methods. Current screening techniques do not maintain the native pairing of variable heavy (VH) and light (VL) antibody chains, or have throughputs limited to a few thousand B cells, whereas repertoires can contain several hundred thousand antibodies.

Eva  
 BLOQUE

Les anticorps thérapeutiques sont de plus en plus utilisés dans les traitements de maladies. Cet essor nécessite la mise en place de méthodes de criblage d'anticorps plus innovantes. Les techniques actuelles de criblage ne maintiennent pas l'appariement natif des chaînes variables lourdes (VH) et légères (VL) d'anticorps, ou ont des débits limités à quelques milliers de cellules B, alors que des répertoires peuvent atteindre plusieurs centaines de milliers d'anticorps.

My project consisted in optimizing an innovative approach to discover antibodies from B cells of immunized mice, which allows to sequence very large repertoires, while maintaining the pairing of antibody chains. This approach, HIBISQUs (High Throughput B cell Immunoglobulin repertoire SeQUencing), is based on droplet microfluidics and high-throughput sequencing (NGS). It consists in capturing, barcoding and retrotranscribing mRNA coding for antibodies from cells encapsulated in drop, then amplifying the VH/VL by PCR in a tube and sequencing them via NGS.

Classique

Mon projet a consisté à optimiser une approche innovante de découverte d'anticorps issus de cellules B de souris immunisées, qui permet de séquencer de très larges répertoires, tout en maintenant l'appariement des chaînes d'anticorps. Cette approche, HIBISQUs (High Throughput B cell Immunoglobulin repertoire SeQUencing), est basée sur la microfluidique en goutte et le séquençage à haut débit (NGS). Elle consiste à capturer, barcoder et à rétrotranscrire les ARNm codant pour des anticorps à partir de cellules encapsulées en goutte, puis à amplifier les VH/VL par PCR en tube et à les séquencer via NGS.

After characterizing drop production and optimizing the PCRs, the HIBISQUs approach was tested on hybridomas and primary mouse B cells. We showed that 100,000 to 1 million cells could be processed in a single experiment. In addition, from 500,000 primary cells enriched in B cells, more than 21,000 paired VH/VL sequences were recovered.

Après avoir caractérisé la production des gouttes et optimisé les PCRs, l'approche HIBISQUs a été testée sur des hybridomes et sur des cellules B primaires de souris. Nous avons montré que 100 000 à 1 million de cellules pouvaient être traitées en une expérience. De plus, à partir de 500 000 cellules primaires enrichies en cellules B, plus de 21 000 séquences VH/VL pairées ont été obtenues.

This study is a proof-of-concept of the HIBISQUs approach, which allows to sequence several tens of thousands of natively paired antibody chains using drop microfluidics and NGS. Additional experiments need to be repeated to confirm these results and test the robustness of the process, however the approach is promising. It would generate a large amount of data that could be used by artificial intelligence to improve antibody discovery.

Cette étude est une preuve de concept de l'approche HIBISQUs, qui permet de séquencer plusieurs dizaines de milliers de chaînes d'anticorps nativement pairés grâce à la microfluidique en goutte et au NGS. Des expériences additionnelles doivent être répétées pour confirmer ces résultats et tester la robustesse du procédé, cependant l'approche est prometteuse. Elle permettrait de générer une grande quantité de données utilisables par l'intelligence artificielle pour améliorer la découverte d'anticorps.

LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Eric TRABLY

Optimisation de la production par voie microbienne d'acide propionique à partir de biodéchets

Rapport non confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Acide propionique, fermentation, déchets organiques, acides gras volatils, optimisation de procédé

Dans le cadre de la valorisation des déchets et de la réduction des émissions de CO<sub>2</sub>, le projet européen Biocane vise à développer un nouveau procédé de conversion des déchets organiques en biocarburants pour avions. La première étape de ce procédé est la conversion biotechnologique des déchets organiques en acide propionique, une molécule plateforme utilisée ensuite pour la synthèse du biokérosène. C'est le but de ce stage, en utilisant un processus de fermentation avec des cultures mixtes pour convertir les déchets organiques en AGVs et en particulier en acide propionique. Pour ce faire, l'optimisation à la fois les paramètres abiotiques (pH, température et concentration de déchets organiques) et les paramètres biotiques (méthodes d'inoculation, origine de l'inoculum et stockage) a été réalisée. Les meilleures conditions opératoires pour l'accumulation d'acide propionique ont été déterminées comme étant un pH initial de 9, une température de 35°C et une concentration initiale de substrat de 7,8 g VS/L ; atteignant  $1,71 \pm 0,14$  g/L d'acide propionique soit  $50,4 \pm 12,5$  % des métabolites totaux après élimination de l'acide acétique. Concernant les paramètres biotiques, une boue aérobie fraîche prétraitée à 90°C pendant 15 min et un substrat hygiénisé pendant 1h à 70°C (réglementations de l'UE) ont permis d'obtenir  $1,29 \pm 0,74$  g/L d'acide propionique, soit  $53,1 \pm 16,4$  % des métabolites totaux après élimination de l'acide acétique. La question suivante était de trouver une méthode de stockage appropriée pour les boues, afin de préserver les performances pendant plusieurs mois. Les boues ont été stockées à -20°C pendant 1 mois, ce qui a permis d'obtenir  $1,69 \pm 0,26$  g/L d'acide propionique, soit  $57,4 \pm 9,4$  % des métabolites totaux après élimination de l'acide acétique. Des recherches supplémentaires sont nécessaires sur les communautés microbiennes au cours du stockage et dans les différentes conditions de fermentation afin i) d'identifier les souches impliquées dans la production d'acide propionique et ii) de comprendre comment cette production pourrait être améliorée en modifiant le procédé et en utilisant des techniques d'ingénierie microbienne de l'écosystème pour orienter le procédé vers la fermentation de l'acide propionique.

NARBONNE • FRANCE

3/1/2023 → 8/31/2023

Propionic acid, fermentation, organic waste, volatile fatty acids, process optimisation

In the context of waste valorisation and CO<sub>2</sub> emissions reduction, Biocane European project aims at developing a new process for converting organic waste into jet fuels. The first step of this process is the biotechnological conversion of organic waste into propionic acid, a platform chemical further used for biokerosene synthesis. The aim of this internship is to use a mixed-culture fermentation process to convert Food Waste (FW) into VFAs and especially propionic acid. The objective is to enhance propionic acid production among VFAs, by optimising both abiotic parameters (pH, temperature and FW concentration) and biotic parameters (inoculation methods, inoculum origin and storage). The best operating conditions for propionic acid accumulation were determined as an initial pH of 9, a temperature of 35°C and an initial FW concentration of 7.8 g VS/L; reaching  $1.71 \pm$

$0.14$  g/L of propionic acid and  $50.4 \pm 12.5$  % of total metabolites after removing acetic acid. The best performance regarding biotic parameters was obtained with a fresh aerobic sludge, pretreated at 90°C for 15 min and a FW hygienised at 70°C for 1h (EU regulations). These conditions resulted in  $1.29 \pm$

$0.74$  g/L of propionic acid, representing  $53.1 \pm 16.4$ % of total metabolites after removing acetic acid. The next question was to find a suitable storage method for the inoculum, in order to preserve its performances over months. This was set at -20°C for the raw sludge, allowing  $1.69 \pm 0.26$  g/L of propionic acid after a 1-month storage period, representing  $57.4 \pm 9.4$  % of the total metabolite after removing acetic acid. Further investigation on microbial communities during storage and under the different fermentative conditions is needed in order to i) identify the strains involved in the propionic acid production and ii) understand how this production could be enhanced by modifying the process and using microbial engineering techniques of the ecosystem to drive the process to propionic acid fermentation.

Mathilde  
BOURGEOIS

Mobilité

UCB PHARMA (site de Braine-l'Alleud)

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Quentin DEMEYERE

Utilisation de la modélisation hybride pour l'optimisation des procédés fed-batch dans la plate-forme ambr®15

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

ambr®15, culture cellulaire, modèle hybride, stratégie d'alimentation, développement de procédés

Dans l'industrie biopharmaceutique, la réduction des délais de R&D est essentielle pour que les entreprises restent compétitives dans un marché agressif. Pour surmonter ce défi, les procédés sont d'abord développés et optimisés dans des bioréacteurs à petite échelle avant d'être étendus à la production clinique et industrielle. Dans ce contexte, la plateforme de microbioréacteurs ambr®15, un système automatisé à petite échelle permettant le criblage de plusieurs conditions de culture, est un atout pour le développement des procédés. Pouvoir les modéliser avec succès à l'aide d'outils mathématiques et d'IA est devenu un défi majeur car il vise à réduire les activités expérimentales, permettant un développement plus efficace. Différents modèles peuvent être utilisés, comme le modèle hybride, qui est une combinaison d'un modèle mécaniste et d'un modèle empirique. L'objectif de ce stage était de tester une méthodologie de modèle hybride afin de prédire les profils d'alimentation optimaux lors d'expériences en procédés fed-batch pour une meilleure production d'anticorps et une meilleure qualité du produit. La première étape consistait à calibrer le modèle en utilisant les conditions d'alimentation historiques d'UCB sur la plateforme ambr®15. De nouveaux profils d'alimentation ont ensuite été générés et testés en conditions réelles pour comparer les résultats obtenus avec les prédictions du modèle. Ce projet a été mené en collaboration avec une société de modélisation, responsable de la conception de modèles sur leur propre plateforme. L'objectif à long terme est de valider et de généraliser l'utilisation de ce modèle hybride en le standardisant pour réduire les travaux expérimentaux pendant le développement des procédés, économisant ainsi du temps et des ressources.

BRAINE L'ALLEUD • BELGIQUE

3/1/2023 → 8/31/2023

Use of hybrid Modeling for fed-batch process optimization in ambr®15 platform.

ambr®15, cell culture, hybrid model, feeding strategy, process development

In the biopharmaceutical industry, reducing research and development timelines is key for companies to remain competitive in an aggressive market. To overcome this challenge and to reduce costs associated to process development, processes are first developed and optimized in small scale bioreactors before being scaled-up to clinical and manufacturing production. In this context, ambr®15 microbioreactor platform, a small-scale, automated, high-throughput system allowing screening of multiple different culture conditions is a key asset for early process development. In addition to process automation and miniaturization, being able to successfully model processes using mathematical and AI tools has become a major challenge as it aims to reduce the lab activities, allowing more efficient process development. Different models can be used, such as hybrid model, a combination of mechanistic model and data-driven models. The aim of this internship was to test hybrid model methodology in order to predict the optimum feed profiles during fed-batch experiments for better antibody production and product quality. The first step was to calibrate the models using UCB's historical feed conditions on the ambr®15 platform. New feed profiles were then generated using the hybrid model and tested under real conditions to compare the results obtained with the model's predictions. This project was held in collaboration with a tier modeling company, responsible for designing models and feeding strategy on their home-made platform. The long-term aim is to validate and generalize the use of this hybrid model by standardizing it to reduce the needs of small-scale experimental work during process development, thereby saving time and resource to the scale-up phase.

Ruby  
BUISSON-JARRY

Classique

SANOPI PASTEUR

MARCY L'ETOILE • FRANCE

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

10/3/2022 → 9/29/2023

Mise au point de bioréacteurs à usage unique pour la production de protéines recombinantes en systèmes d'expression eucaryote

Transfection, culture cellulaire, polyéthylèneimine, électroporation, bioréacteur à usage unique, protéine recombinante

Pour répondre aux besoins des projets nouveaux vaccins, la plateforme dans laquelle j'ai réalisé mon alternance doit délivrer des quantités importantes de protéines recombinantes. Dans ce but, ma mission a été de développer des protocoles génériques permettant une montée en échelle en bio-générateur pour délivrer rapidement ces protéines qui seront purifiées, caractérisées, utilisées dans le développement des tests immunologiques et comme comparateur dans les études chez la souris. Un protocole a déjà été mis en place pour les productions en système procaryote en utilisant E.coli et un protocole générique est nécessaire pour la production en système eucaryote de protéines ayant des modifications post-traductionnelles. Le choix du système d'expression s'est porté sur des cellules humaines hautement transfectables que sont les cellules Expi293F.

Ainsi j'ai comparé la transfection des cellules Expi293F cultivées en Ambr250 Modular avec 2 méthodes de transfection : une méthode chimique basée sur l'utilisation de polyéthylèneimine (PEI) et une méthode physique l'électroporation (EP). La comparaison de ces 2 méthodes a été faite sur la base de plusieurs critères tels que l'efficacité de transfection, la productivité protéique mais aussi sur la capacité de transposabilité d'échelle et de coût. L'ensemble des critères ont été comparés permettant l'élaboration d'un protocole générique constitué de modules qui seront utilisés pour répondre aux besoins des projets.

To meet the needs of new vaccine projects, the platform that I joined during my work-study project must deliver large amount of recombinant protein. To this end, my mission was to develop generic protocols enabling bio-generator scale-up to rapidly deliver these proteins that will be purified, characterized, used in the development of immunoassays, and as a benchmark in mouse studies. A protocol has already been put in place for the production in prokaryotic system using E. coli and a generic protocol in eukaryotic expression system is required for protein production with post-translational modifications. The choice of eukaryotic expression system focused on highly transfectable human cells, Expi293F cells.

Thus, I compared the transfection of Expi293F cells grown in Ambr250 Modular with 2 transfection methods: a chemical method based on the use of polyethylenimine (PEI) and a physical method of electroporation (EP). The comparison of these 2 methods was made based on several criteria such as the transfection efficiency, the protein productivity, the scalability, and the cost. All the criteria were compared allowing the development of a generic protocol composed of modules that will be used to meet the needs of the projects.

Benjamin  
BURTZ

CP

MERCK BIODEVELOPMENT

MARTILLAC • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Cyrielle CORBIN

3/1/2023 → 8/31/2023

Optimisation d'une plateforme de développement de lignée cellulaire CHO

CHO Cell Line Development platform optimization

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Contract Testing Development Manufacturing Organisations (CTDMO), Développement de lignées cellulaires (CLD), culture cellulaire, design de plasmides, transfection, bioproduction d'anticorps monoclonaux

Contract Testing Development Manufacturing Organisations (CTDMO), Cell Lines Development (CLD), cell culture, plasmid design, transfection, mAb bioproduction

Charlotte  
 BUZZOLINI

Mobilité

L'entité Life Science de Merck Biovelopment est une CTDMO spécialisée dans le développement de procédés de bioproduction de protéines, principalement des anticorps monoclonaux, via cellules CHO. Le développement des lignées cellulaires (CLD) est la première étape du procédé et consiste à la génération d'un clone stable exprimant la molécule d'intérêt. Pour garantir un service CLD compétitif, notamment sur la durée du développement et les titres finaux, l'amélioration en continue de la plateforme est nécessaire. De nouvelles technologies sont donc évaluées pour améliorer la productivité et la stabilité des clones générés.

Life Science entity of Merck Biodevelopment is a CTDMO specialized in the development of bioproduction process of proteins, mainly monoclonal antibodies, via CHO cells. Cell Line Development (CLD) is the first step of the process and consists of stable clone generation expressing the molecule of interest. To ensure a competitive CLD service, notably in term of delivery delay and final titers, the continuous improvement of the platform is necessary. Innovative technologies are thus evaluated to improve productivity and stability of generated clones.

Dans ce cadre, la stabilité d'un clone est un critère industrielle important pour garantir une homogénéité des performances du clone, en termes de croissance et de production, tout au long du procédé. La durée d'une production GMP est estimée à 60 générations cellulaires. L'étude de stabilité implique la décongélation de pools et clones précédemment générés, leur expansion jusqu'à 60 générations et le lancement de test de production fed-batch en début, milieu et fin d'expansion. En moyenne, 83% des clones testés sont stables.

In this context, clone stability is a major industrial criterion to ensure the homogeneity of clone performances, in term of growth and production, throughout the process. The duration of a GMP production is estimated at 60 cell generations. The clone stability study consists of thawing of clones and pools previously generated, their expansion until 60 cell generations and the launched of production tests in fed batch mode at the beginning, the middle and the end of cell expansion. Overall, results show an average of 83% of clone tested stable.

La seconde partie de mon projet est une preuve de concept visant à démontrer que la multiplication du nombre de copies du gène d'intérêt dans le génome de la cellule hôte permet de booster sa productivité. Pour cela, deux plasmides vont être conçus portant chacun la cassette d'expression de la protéine d'intérêt et différents outils moléculaires et épigénétiques décrits comme améliorant la productivité. Enfin pour s'assurer de la bonne intégration des deux vecteurs, deux pressions de sélections différentes seront utilisées. Le premier challenge de cette étude est donc la mise en place de la double pression de sélection. Une étude préliminaire a été conduite afin de déterminer le ratio d'ADN plasmidique optimal lors de la co-transfection ainsi que la meilleure stratégie d'application de la double pression de sélection.

The second part of my project is a proof of concept (POC) aiming to demonstrate that the multiplication of gene of interest copy number in host cell genome can boost the productivity. For that, two plasmids will be design, each carrying the expression cassette of the protein of interest and different molecular and epigenic tools described as improving productivity. Finally, to ensure the good integration of both vectors, two different selection pressures will be used. The first challenge of this study is to set up the double selection pressure. A preliminary study is conducted to determine the optimal plasmid DNA ratio for co transfection and the best strategy for the double selection pressure application.

EVONIK (SEA) PTE LTD

138567 • SINGAPOUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Dhivya DADLANI

3/8/2023 → 8/31/2023

Optimisation du développement de modèles de peau in vitro grâce à un système de culture cellulaire automatisée

Optimization of in vitro skin model development using an automated cell culture system

Rapport confidentiel  
 Soutenance non confidentielle

Automatisation – Modèles de peau – Culture cellulaire en 3D – Culture cellulaire – Optimisation – Liquid handler

Automation – Skin models – 3D cell culture – Cell culture – Optimization – Liquid handler

Blandine  
 CHAPERT

Classique

Lors du développement de produits cosmétiques, il est nécessaire de tester leur efficacité. L'utilisation des modèles de peau 3D permet d'obtenir des résultats indiquant l'efficacité et le mécanisme d'action des produits et ingrédients. La production de ces modèles est un procédé complexe qui requiert du temps. L'automatisation faciliterait la réalisation de ces modèles et réduirait la durée des opérations tout en augmentant la précision et la répétabilité. Pour cela, des modèles de peau utilisant des cellules primaires ont été fait manuellement et comparés à ceux réalisés automatiquement. Dans le cadre de ce projet, la solution automatique utilisée était un système robotique de pipetage de solutions. Ce système a permis l'obtention d'un environnement plus aseptique, des pipetages de précisions et répétables. Grâce à ces caractéristiques, quatre protocoles principaux ont été testés pour définir s'ils pouvaient remplacer ceux réalisés manuellement. Pour cela, les protocoles implémentés sur le système ont été validés avec de l'eau avant l'utilisation des réactifs et des cellules. Les deux méthodes ont été comparées selon les critères suivants : l'épaisseur des modèles de peau et l'aspect général des modèles (formation de l'épiderme et du derme). Lors de l'obtention des résultats, si les modèles ne rencontraient pas les critères de qualités définis, des optimisations supplémentaires ont été réalisées. Dans la dernière partie de ce projet, les protocoles ont été révisés et optimisés en collaboration avec un spécialiste du système robotique pour assurer leurs transferts à de futurs opérateurs. Suite à cela, les quatre protocoles développés ont passé une validation finale avec de l'eau avant d'utiliser des cellules et réactifs. Les résultats obtenus ont permis de valider deux protocoles ayant été testés indépendamment. La réalisation complète des modèles de peau avec le système et les protocoles révisés restent à être validés avec les cellules et réactifs.

The skin is the largest organ of the human body and a complex organ. However, this organ has been extensively studied, leading to the development of various models such as 2D and 3D models that can be compared to animal models. When developing cosmetic products, it is necessary to test their effectiveness. The use of 3D skin models provides results indicating the effectiveness and mechanism of action of products and ingredients. However, this is a complex and time-consuming process. Automation in the laboratory would facilitate the realization of these models and reduce the duration of operations while increasing accuracy, repeatability and the production capacity. For this, skin models using primary cells were either made manually or automatically. In this project, the automatic solution used was a liquid handling system. This system has resulted in a more aseptic environment, precision and repeatable pipetting. Thanks to its characteristics, four main protocols were tested to determine whether they could replace those carried out manually. To begin, the protocols implemented on the liquid handler were validated with water. The two methods were compared according to the following criteria: thickness of skin models and general appearance of models (formation of dermis and epidermis). Regarding the results, if the models did not meet the defined quality criteria, additional optimizations were made. In the last part of this project, the protocols were revised and optimized in collaboration with the liquid handling system specialist to ensure their transfer to future operators. Following this, the four protocols developed passed a final validation with water. The results obtained successfully validate two protocols that had been tested independently. Another required additional optimizations and the last one could not be optimized due to its complexity. The complete realization of the skin models with the system and the revised protocols remains to be validated with the cells and reagents.

## NOVEAL

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

Développement d'un procédé de fermentation en vue de la synthèse de précurseurs de céramides

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Fermentation, levure, culture cellulaire, bioréacteurs, montée en échelle, optimisation de procédé industriel, transferts thermodynamiques, céramides, sphingolipides.

Dans le contexte de la demande croissante des consommateurs pour des produits cosmétiques plus naturels, plus respectueux de l'environnement, les biotechnologies blanches apparaissent comme une réelle alternative à la production d'ingrédients cosmétiques plus durables. L'utilisation de micro-organismes (bactéries, levures, microalgues ou encore champignons) à l'échelle industrielle permet la production d'ingrédients alternatifs à ceux issus de la pétrochimie. C'est dans ce cadre que Novéal conçoit des procédés de fabrication dans ses différents laboratoires de Recherche & Développement.

Les céramides, naturellement présent dans la peau et sur les écailles du cheveux, sont des actifs reconnus pour de nombreuses applications cosmétiques et dermatologiques du soin de la peau, ainsi que pour le soin capillaire. Novéal s'est donc intéressé à la production par fermentation d'un précurseur (base sphingolipide) de céramides. De nombreuses missions, du criblage de conditions de culture jusqu'à la montée en échelle, m'ont été confiées au sein du laboratoire de biotechnologies de Novéal. Les expérimentations de criblage de conditions de culture en micro-bioréacteur (BioLector) ont permis l'optimisation de la production de métabolites secondaires d'intérêts par une souche sauvage de levure. Les meilleures conditions ont pu ensuite être testées en bioréacteurs à l'échelle de 2L, de 5L et de 30L afin de les confirmer. L'enjeu majeur de ce stage est de rendre le procédé de fermentation viable à l'échelle industrielle pour permettre la production de céramides, et répondre à la demande des différentes marques du Groupe L'Oréal.

## LE THILLAY • FRANCE

3/6/2023 → 8/31/2023

Development of a fermentation process for the synthesis of ceramide precursors

Fermentation, yeast, cell culture, bioreactors, scaling up, industrial process optimization, thermodynamic transfers, ceramides, sphingolipides.

In the context of growing consumer demand for more natural, more eco-friendly cosmetic ingredients, White Biotechnology appears as a real alternative to the production of more sustainable cosmetics. The use of microorganisms (bacteria, yeasts, microalgae, or fungi) on an industrial scale allows the production of alternative ingredients from petrochemicals. It is in this frame that Novéal designs manufacturing processes in its Research & Development laboratories. Ceramides, naturally present in the skin and on hair scales, are active ingredients recognized for many cosmetic and dermatological applications of skin care, as well as for hair care. Novéal was therefore interested in the production by fermentation of a ceramide's precursor (sphingoid base). Many missions, from the screening of culture conditions to scaling up, have been entrusted to me in the Novéal biotechnology laboratory. Microbioreactor culture conditions screening experiments (BioLector) have optimized the production of secondary metabolites of interest by a wild strain of yeast. The best conditions could then be tested in bioreactors at 2L, 5L and 30L scales to confirm them. The major challenge of this internship is to make the fermentation process viable on an industrial scale to allow the production of ceramides and meet the demand of the various brands of the L'Oréal Group.

Jeanne  
COUPEAU

Classique

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

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

Chargé de recherche en biotechnologies

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Culture Cellulaire – Anticorps recombinants – Transfection – Plateforme automatisée – Haut débit – Optimisation – Recherche

La plateforme AMP (Automated Monoclonal antibodies Production) fait partie intégrante du site de Recherche de Vitry-sur-Seine de Sanofi. Créée en 2018, cette plateforme robotisée, purifie et caractérise des anticorps recombinants à haut débit. La production est réalisée à deux échelles : le « mL scale » qui délivre 1mL de surnageant d'anticorps non purifié et le « mg scale » qui délivre 1mg d'anticorps purifié. La plateforme permet de soutenir les activités de recherche des aires thérapeutiques de Sanofi, en particulier l'oncologie et l'immuno-inflammation. Initialement tournée vers la production d'anticorps monoclonaux, la plateforme se diversifie pour répondre aux besoins et avancées de la recherche, en produisant des formats innovants d'anticorps, tels que les anticorps multispécifiques.

La plateforme robotisée nécessite régulièrement des développements et optimisations de procédés. Les enjeux de la production sur la plateforme sont de produire plus d'anticorps, en nombre et en quantité délivrée ; de réduire les coûts ainsi que le temps de production et pour cela d'automatiser au maximum les processus. L'objectif de mon stage était donc l'optimisation des procédés de production pour le « mg scale ». Plusieurs protocoles de transfection sont en place impliquant différents types cellulaires telles que les CHO et les Expi293F. Pour répondre aux objectifs d'harmonisation globale de l'entreprise, une nouvelle lignée CHO doit être implantée sur la plateforme. La mission principale de ce stage était donc d'adapter le protocole de transfection de cette nouvelle lignée pour une production sur la plateforme automatisée. Pour cela j'ai travaillé, en parallèle, à la mise en place de deux protocoles basés sur deux techniques de transfection : la lipofection et l'électroporation. De plus, pour répondre à des besoins internes de l'entreprise dans la recherche de réduction des coûts, j'ai également étudié la possibilité de transfecter les cellules Expi293F avec de nouveaux vecteurs.

VITRY SUR SEINE • FRANCE

3/6/2023 → 9/1/2023

Biotechnology researcher

Cell culture - Recombinant antibodies - Transfection - Automated platform - High throughput - Optimization – Research

The AMP (Automated Monoclonal antibodies Production) platform is an integral part of Sanofi's Vitry-sur-Seine research site. Created in 2018, this robotic platform purifies and characterizes recombinant antibodies at high throughput. Production is carried out on two scales: the "mL scale", which delivers 1 mL of unpurified antibody supernatant and the "mg scale", which delivers 1 mg of purified antibody. The platform supports research activities of Sanofi's therapeutic areas, in particular oncology and immuno-inflammation. Initially focused on the production of monoclonal antibodies, the platform is diversifying to meet the needs and advances of research by producing innovative antibody formats such as multispecific antibodies.

The robotic platform requires regular process development and optimization. The challenges of the production on the platform are to produce more antibodies, in terms of number and quantity delivered; to reduce costs and production time, and to automate processes as much as possible. The aim of my internship was therefore to optimize the production processes for the "mg scale". There are several transfection protocols in use, involving different cell types such as CHO and Expi293F. To meet the company's global harmonization objectives, a new CHO line needed to be implemented on the platform. The main task of this internship was to adapt the transfection protocol of this new cell line for the production on the automated platform. To do this, I worked in parallel on implementing two protocols based on two transfection techniques: lipofection and electroporation. I also studied the possibility to transfect Expi293F cells with new vectors to meet the company's internal needs in terms of cost reduction.

Ambrine  
CRESPIN

Mobilité

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

VITRY SUR SEINE • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Nasire MAHMUDI

10/3/2022 → 9/29/2023

Evaluation du potentiel d'anticorps anti-cibles pour des immunothérapies ciblant les lymphocytes Natural killer

I completed my internship at Sanofi Aventis R&D in Immuno-Oncology. The main objectives of this year were to understand the targets ligand/receptor and their interaction, but also to implement Natural killer (NK) killing assays to test the potential for a

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Culture cellulaire, Cytométrie, IncuCyte, co-cultures, MSD, NK, immunothérapies, purification de cellules sanguines

Cell culture, Cytometry, IncuCyte, co-cultures, MSD, NK, immunotherapies, blood cells purification

Diane  
D'ESQUERMES

CP

J'ai réalisé mon stage au sein de Sanofi Aventis R&D en Immuno-oncologie. Celui-ci avait pour objectifs principaux la compréhension des cibles ligand/ récepteur et de leur interaction, mais aussi la mise en place de tests de mort induite par les cellules Natural killers (NK) afin de tester le potentiel d'anticorps anti-cibles.

Pour ce faire, nous avons mis en place les outils de détection des cibles, mais aussi développé des lignées adaptées aux tests. Nous avons mené des doubles transductions afin de générer des lignées adaptées à l'imagerie (cellules fluorescentes) et surexprimant le ligand. De plus, des protocoles intégrant de la cytométrie en flux ont été mis en place pour caractériser les cellules effectrices de la mort (NK), mais aussi les cellules cibles (cancéreuses), en regardant notamment les expressions des ligands/ récepteurs.

Ce sont donc plusieurs méthodes qui ont été utilisées : purification de cellules sanguines, cytométrie de flux, transduction, tri cellulaire, imagerie et mesure de l'impédance, afin d'avoir des tests robustes de suivis de mort cellulaire et de mesure d'activité des anticorps candidats.

Enfin, pour aller plus loin dans la compréhension des résultats, des techniques de dosage de cytokines, de type MSD, sont utilisées pour associer images et analyses biologiques.

Une fois les outils (lignées & anticorps) mis en place, les paramètres optimums pour les essais de mort (ratio Cible : NK, activité des composés), ont pu être déterminés. Les composés démontrent un haut potentiel, avec une forte capacité à restaurer l'activité des NK, visible autant par imagerie, que par dosage des cytokines.

Tout au long du stage, j'ai donc pu utiliser diverses techniques pour atteindre les objectifs, et réussir à démontrer le potentiel d'anticorps anti-cibles. Les résultats obtenus ont permis de démontrer pour la première fois en interne l'activité des composés, et vont permettre de faire évoluer le projet.

I completed my internship at Sanofi Aventis R&D in Immuno-Oncology. The main objectives of this year were to understand the targets ligand/receptor and their interaction, but also to implement Natural killer (NK) killing assays to test the potential for anti-target antibodies.

To do this, we put in place target detection tools, and we developed appropriate cell lines. We conducted double transductions to generate imaging-appropriate (fluorescent cells) cell lines overexpressing our ligand. In addition, protocols incorporating flow cytometry have been used to characterize effector cells (NK), but also target cells (cancerous), particularly looking at ligand/receptor expressions.

Therefore, several methods have been used: blood cells purification, flow cytometry, transduction, cell sorting, imaging, and impedance measurement, in order to have robust killing assays and candidate antibody activity measurement.

Finally, to go further into the understanding of the results, cytokine dosage techniques, such as MSD, were used to combine images and biological analyses.

Once the tools (cell lines and antibodies) were set, the optimal parameters for the killing assays (Target : NKs ratio, compounds activity), were determined. The compounds demonstrated high potential, with a strong ability to restore NK activity, visible on both imaging and cytokine assays. To conclude, throughout my internship, I was able to use various techniques to achieve our goals, and successfully demonstrated the potential of anti-target antibodies. The results obtained enabled the internal demonstration of the activity of the compounds for the first time and will allow the project to evolve.

I completed my internship at Sanofi Aventis R&D in Immuno-Oncology. The main objectives of this year were to understand the targets ligand/receptor and their interaction, but also to implement Natural killer (NK) killing assays to test the potential for anti-target antibodies.

To do this, we put in place target detection tools, and we developed appropriate cell lines. We conducted double transductions to generate imaging-appropriate (fluorescent cells) cell lines overexpressing our ligand. In addition, protocols incorporating flow cytometry have been used to characterize effector cells (NK), but also target cells (cancerous), particularly looking at ligand/receptor expressions.

Therefore, several methods have been used: blood cells purification, flow cytometry, transduction, cell sorting, imaging, and impedance measurement, in order to have robust killing assays and candidate antibody activity measurement.

Finally, to go further into the understanding of the results, cytokine dosage techniques, such as MSD, were used to combine images and biological analyses.

Once the tools (cell lines and antibodies) were set, the optimal parameters for the killing assays (Target : NKs ratio, compounds activity), were determined. The compounds demonstrated high potential, with a strong ability to restore NK activity, visible on both imaging and cytokine assays. To conclude, throughout my internship, I was able to use various techniques to achieve our goals, and successfully demonstrated the potential of anti-target antibodies. The results obtained enabled the internal demonstration of the activity of the compounds for the first time and will allow the project to evolve.

SANOFI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Behazine COMBADIÈRE

Développement de panels de cytométrie spectrale pour caractériser la réponse immunitaire des cellules T et B

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Développement, cytométrie spectrale, panel, marqueurs, cytokines, vaccin, spécificité antigénique, réponse immunitaire

Afin d'évaluer l'immunogénicité de candidats vaccins, le suivi de la réponse immunitaire à la suite d'une vaccination est crucial. Ce suivi peut s'effectuer grâce à la cytométrie en flux. Etant donné la grande variabilité de marqueurs pour suivre les différentes populations de cellules immunitaires, la technologie de la cytométrie spectrale est utilisée. Cette dernière permet d'utiliser des panels de marqueurs contenant jusqu'à 35 couleurs, ce que la cytométrie conventionnelle n'est pas capable de faire. Contrairement à la cytométrie conventionnelle où seul le pic d'émission du fluorochrome est pris en compte, en cytométrie spectrale, l'entièreté du spectre du fluorochrome est analysée par les dizaines de détecteurs (64 détecteurs qui capture les émissions de 365 à 829nm).

Mon PFE s'est divisé en 2 missions. La première consistait à valider un panel déjà développé et à l'appliquer sur des échantillons. Ce panel a pour objectif de suivre les différentes populations de cellules T spécifiques d'antigènes vaccinaux en fonction de leur état de différenciation vers la cellule effectrice produisant des cytokines et chimiokines. Après avoir testé le panel sur plusieurs échantillons et validé le protocole, le panel est utilisé dans le cadre d'un projet pour vérifier la réponse immunitaire à différents pools de peptides d'un virus respiratoire.

La seconde partie consistait à développer un panel afin de suivre la réponse immunitaire des lymphocytes B et suivre les différentes populations (mémoire, transitionnel, naïve...). Après avoir défini les marqueurs nécessaires au suivi des différentes populations en fonction des données de la littérature, le panel est construit en attribuant à chaque anticorps anti-marqueur un fluorochrome adapté puis les anticorps sont titrés individuellement puis ensemble. Le panel est ensuite testé sur des donneurs de l'EFS afin de confirmer les titres et valider le panel en appliquant une stratégie d'analyse des populations de lymphocytes B.

A l'avenir, ces deux panels seront utilisés dans les différents projet du département Global Immunology pour suivre la réponse immunitaire de patients dans le cadre du développement de vaccins.

MARCY L'ETOILE • FRANCE

3/27/2023 → 9/22/2023

Development of spectral cytometry panels to characterize the immune response of T and B cells

development, spectral flow cytometry, panel, markers, cytokines, vaccine, antigenic specificity, immune responses

In order to assess the immunogenicity of candidate vaccines, it is crucial to monitor the immune response following vaccination. This can be done using flow cytometry. Given the wide variability of markers for monitoring different immune cell populations, spectral cytometry technology is used. Spectral cytometry allows the use of marker panels containing up to 35 colours, which conventional cytometry is unable to do. Unlike conventional cytometry where only the emission peak of the fluorochrome is considered, in spectral cytometry the entire spectrum of the fluorochrome is analysed by dozens of detectors (64 detectors that capture emissions from 365 to 829nm).

My PFE was divided into 2 tasks. The first involved validating a panel that had already been developed and applying it to samples. The aim of this panel is to monitor the different populations of vaccine antigen-specific T cells according to their state of differentiation into effector cells producing cytokines and chemokines. After testing the panel on several samples and validating the protocol, the panel was used as part of a project to verify the immune response to different pools of peptides from a respiratory virus.

The second part consisted of developing a panel to monitor the immune response of B lymphocytes and track the different populations (memory, transitional, naïve...). After defining the markers required to monitor the different populations based on data in the literature, the panel was designed by assigning a suitable fluorochrome to each anti-marker antibody, then the antibodies were titrated individually and then together. The panel is then tested on EFS donors to confirm titres and validate the panel by applying a strategy for analysing B lymphocyte populations.

In the future, these two panels will be used in the Global Immunology department's various projects to monitor the immune response of patients as part of vaccine development.

Laurie  
DESBOIS

Mobilité

VEOLIA RECHERCHE ET INNOVATION (VERI)

MAISONS LAFFITTE • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Adèle LAZUKA

3/27/2023 → 9/26/2023

Bioconversion du CO2 par électrosynthèse microbienne

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Bioélectrochimie, bioprocédé, bioraffinerie environnementale, dioxyde de carbone, matières organiques, valorisation, économie circulaire

L'augmentation de la concentration de gaz à effet de serre dans l'atmosphère depuis l'ère industrielle est la cause majeure du changement climatique. En 2019, le dioxyde de carbone représentait ainsi 75% des gaz à effet de serre émis en France.

De fait, de nouvelles technologies basées sur la bioraffinerie environnementale et le captage, stockage et la valorisation du CO2 (CCUS-Carbon Capture, Use and Storage) sont développées afin de réduire notre empreinte carbone. Parallèlement, des recherches sont menées depuis plusieurs années en bioélectrochimie et en 2010, le procédé d'électrosynthèse microbienne est découvert. L'électrosynthèse microbienne permet la bioconversion du CO2 en molécules organiques d'intérêt par des microorganismes électroactifs, c'est-à-dire capables de récupérer les électrons d'une électrode pour les utiliser dans leur métabolisme. Les électrons peuvent être apportés abiotiquement par l'électrolyse de l'eau ou biotiquement par d'autres microorganismes électroactifs qui cèdent des électrons par la dégradation de matières organiques.

Le projet dans lequel ce stage s'inscrit consiste à développer ce procédé et le tester en sélectionnant des populations de microorganismes efficaces et en en déterminant les paramètres de performances. Les fonctionnements abiotiques et biotiques ont été réalisés afin de les comparer. Les premiers résultats obtenus sur ce dispositif permettront d'évaluer l'intérêt de ce type de dispositif, ainsi que d'entrevoir la faisabilité industrielle de l'électrosynthèse microbienne.

Since the industrial age, the greenhouse gas concentration increase is the main cause of global warming. In 2019, 75% of greenhouse gases produced in France were carbon dioxide (CO2).

Thereby, new technologies based on environmental biorefinery and CO2 Capture, Use and Stockage (CCUS) are developed to reduce our carbon footprint. Simultaneously, for several years research has been conducted in bioelectrochemistry, and in 2010, the process of microbial electrosynthesis was discovered. Microbial electrosynthesis allows CO2 bioconversion in high-value organic molecules thanks to electroactive microorganisms which can use electrons from electrodes for their metabolism. Electrons can be brought abiotically, with water electrolysis, or biotically with other electroactive microorganisms which produce electrons by degrading organic matters from human activity. The project of this internship aims to develop this process and to test it by selecting efficient microbial populations and determining its performance. Both the abiotic and biotic processes were evaluated in order to compare them. The first results obtained with this technology will allow us to assess the interest in this type of process as well as define its industrial feasibility.

Gabrielle  
DESLANDES

CBI

EXPLICITTE – ImmuSmol

BORDEAUX • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Alban BESSEDE

10/3/2022 → 11/30/2023

Évaluation d'un nouveau candidat inhibiteur de point de contrôle immunitaire ciblant l'axe TIGIT-PVR sur des sphéroïdes de sarcome en co-culture avec des cellules immunes

Recherche, Oncologie, Immunothérapie, Sphéroïdes, In vitro, Culture cellulaire, Killing assay, Cytométrie en flux

Celine  
DUGAT

CP

L'immunothérapie représente aujourd'hui une arme thérapeutique majeure en oncologie, notamment grâce au développement des bloqueurs de points de contrôle immunitaires (comme Anti-CTLA4, anti-PD1/PDL1). Alors que certaines de ces molécules sont approuvées pour le traitement de divers cancers tels que le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), du mélanome ou du cancer de la vessie, aucune ne l'est encore pour les sarcomes. Des recherches additionnelles sur de nouveaux points de contrôle immunitaire pourraient permettre le développement de stratégies thérapeutiques innovantes dans cette indication où les modalités de prise en charge n'ont pas évoluées depuis plus de cinquante ans.

Pour le développement de nouvelles stratégies, un élément clé est l'utilisation de modèles cellulaires représentant au mieux la physiopathologie d'une tumeur en mimant notamment les interactions cellulaires (cellules tumorales entre elles, cellules tumorales avec les cellules immunes, etc.). Dans ce sens, la mise en place de modèles de co-culture de cellules tumorales en trois dimensions sous forme de sphéroïde et de cellules immunes est une approche prometteuse permettant d'évaluer des nouvelles molécules capables d'activer les cellules immunes et d'induire in fine la mort des cellules tumorales.

Les objectifs de ce stage ont donc été multiples. Tout d'abord, nous avons caractérisé l'effet d'une molécule immunomodulatrice ciblant un axe de contrôle immunitaire – l'axe PVR / TIGIT - sur les modèles de co-culture 2D conventionnels. Afin d'évaluer cette molécule, sur un modèle in vitro plus relevant, un modèle de co-culture de lignées cellulaires de sarcome humain sous forme de sphéroïde et des cellules immunes a été développé. Différentes étapes de mise au point ont permis la définition des conditions expérimentales favorisant l'obtention de sphéroïde ainsi que l'identification de paramètres de lecture pertinents.

Presently, the immune checkpoint blockers development is a revolutionary milestone in the field of Immuno-oncology. While some of these molecules (eg. Anti-CTLA4, anti-PD1/PDL1) are indeed approved for the treatment of various cancers such as non-small cell lung cancer (NSCLC), melanoma or bladder cancer, none are yet implicated for the utilization in sarcoma. However, recent research on new immunological checkpoints may allow for the creation of novel therapeutic tactics, while the treatment methods have not advanced for the late fifty years.

A key point to permit the development of these new strategies is the use of relevant in vitro models that best represent the pathophysiology of a tumor by mimicking in particular cellular interactions, eg. tumor cells with each other or tumor cells with immune cells. The establishment of spheroid tumor cell and immune cell co-culture models is a viable strategy for testing novel compounds capable of stimulating immune cells and, eventually, triggering tumor cell death.

The goals for this internship were diverse. First, we were able to determine the effect of an immunomodulatory drug targeting an immunological checkpoint – the PVR / TIGIT axis - on "conventional" 2D co-culture models. Then, in order to more accurately assess the effects of this molecular model, an in vitro model based on the co-culture of human sarcoma cell lines in the form of a spheroid and immune cells was established. The various phases of development allowed for the identification of key readouts as well as the establishment of experimental conditions promoting the formation of spheroids.

TREEFROG

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Lucie REMICHIUS

Développement d'un protocole expérimental pour l'évaluation de l'impact de C-Stem<sup>TM</sup> sur la fonctionnalité des cellules tueuses naturelles (NK)

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Thérapie cellulaire, iPSC, Immuno-oncologie, Natural Killer, test de cytotoxicité in vitro

L'émergence de la thérapie cellulaire a suscité un engouement sans précédent dans la lutte contre le cancer. En effet, ces dernières années l'utilisation des CAR-T cells a révolutionné le traitement des lymphomes, myélomes et autres cancers hématologiques. Grâce à leur capacité de destruction des cellules malignes, les cellules tueuses naturelles (Natural Killer cells) offrent une nouvelle perspective à l'immunothérapie. Les CAR-NK cells (cellules lymphocytes tueuses naturelles porteuses d'un récepteur chimérique) permettent simultanément d'améliorer l'efficacité et de contrôler les effets indésirables.

TreeFrog Therapeutics a développé une technologie propriétaire, C-Stem<sup>TM</sup> permettant la culture 3D de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), dans des microcapsules d'alginate. La capsule mime les conditions in vivo, en permettant la culture des cellules souches sous forme d'un épiblaste et les protège des contraintes imposées par la culture en bioréacteur. Ce procédé permet la production à grande échelle de thérapies issues d'iPSC et ainsi d'en réduire drastiquement les coûts.

TreeFrog Therapeutics souhaite explorer l'utilisation de sa technologie d'encapsulation à l'expansion de types cellulaires sensibles à grande échelle, notamment aux cellules lymphocytaires, sans impacter ni la qualité, ni la fonctionnalité. Dans cette démarche, mon contrat de professionnalisation consiste à étudier les fonctions cytotoxiques in vitro des lymphocytes NK, après culture en capsule ou en suspension. L'objectif principal de mon travail a été de développer des tests de cytotoxicité à l'aide d'un système d'imagerie en temps réel. J'ai mis en place un protocole expérimental in vitro en utilisant un modèle de co-culture de cellules cancéreuses et de Natural killer issues de sang périphérique (PB-NK), afin d'évaluer le potentiel de cette technologie pour le développement d'immunothérapie à grande échelle.

Antoine  
DUVILLARD

CP

PESSAC • FRANCE

10/3/2022 → 11/28/2023

Development of an experimental protocol to assess the impact of C-Stem<sup>TM</sup> on the functionality of Natural Killer (NK) cells

Cell therapy, iPSC, Immuno-oncology, Natural Killer, in vitro cytotoxicity assay

The emergence of cell therapy has generated unprecedented interest in the fight against cancer. In recent years, the use of CAR-T cells has revolutionized the treatment of lymphoma, myeloma, and other hematological cancers. Thanks to their ability to destroy malignant cells, natural killer cells offer a new perspective on immunotherapy. CAR-NK cells (natural killer lymphocytes carrying a chimeric receptor) simultaneously improve efficacy and control side effects.

TreeFrog Therapeutics has developed a proprietary technology, C-Stem<sup>TM</sup> enabling the 3D culture of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in alginate microcapsules. The capsule mimics the in vivo conditions of stem cells, allowing them to be grown as epiblasts and protecting them from the constraints imposed by bioreactor culture. This process makes large-scale production of iPSC-derived therapies, drastically reducing costs.

TreeFrog Therapeutics aims to explore the use of its encapsulation technology for the expansion of sensitive cell types on a large scale, in particular lymphocyte cells, without impacting either quality or functionality. As part of this approach, my professionalization contract involved studying in vitro cytotoxic functions of NK cells, after culture in capsule or suspension. The main objective of my work was to develop cytotoxicity assays using a real-time imaging system. I set up an in vitro experimental assay using a co-culture model of cancer cells and Natural Killers cells from peripheral blood (PB-NK) cells to evaluate the potential of this technology for large-scale immunotherapy.

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Hélène LIGONY

Optimisation de procédés

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Lyse – Purification – Développement/ Optimisation de procédés – Biocatalyse

Le département dans lequel le stage a été effectué est engagé dans la recherche de nouvelles voies de synthèse ou l'amélioration de voies existantes en utilisant des catalyseurs d'origine biologique dans une démarche d'EcoDesign. L'utilisation de catalyseurs biologiques permet le remplacement d'étapes chimiques coûteuses et/ou moins viables environnementalement. Le stage a porté sur l'optimisation de procédés d'extraction et de purification de ces biocatalyseurs.

Dans un premier temps, le procédé de lyse via un microfluidiseur est étudié. Au laboratoire, l'efficacité de la lyse est évaluée par des observations microscopiques avant/après lyse. Il a été nécessaire de déterminer une mesure quantitative pour quantifier l'efficacité de la lyse et comparer les différentes conditions testées. Une approche par plan d'expériences a été choisie afin de déterminer les conditions pour lesquelles l'efficacité de la lyse est maximisée. Elle a permis de déterminer l'influence de chaque facteur sur l'efficacité de la lyse ainsi que certaines conditions semblant optimales. Toutefois, l'efficacité de la lyse ne doit pas être décorrélée de l'activité enzymatique. En effet, des conditions favorisant la lyse peuvent dégrader les enzymes. Cela nécessite de trouver le bon équilibre entre ces deux paramètres. Ainsi, les activités enzymatiques ont été d'abord déterminées dans les lysats issus de certaines conditions de lyse puis sur des solutions purifiées pour les meilleures d'entre elles. La seconde partie du stage a consisté à la mise en place d'une étape d'échange de tampon sur AKTA. En effet, le procédé actuel de purification est composé de deux étapes : une étape de chromatographie d'affinité et une d'échange de tampon. L'échange de tampon est effectué de manière manuelle sur des colonnes à usage unique. Afin de réduire le coût de l'étape tant d'un point de vue consommable qu'humain, il a été décidé de la mettre en place sur AKTA puis de l'optimiser.

VITRY SUR SEINE CEDEX • FRANCE

3/6/2023 → 8/25/2023

Lysis – Purification - Process Optimisation/Development - Biocatalysis.

The internship has been carried out in a department involved in the research into new synthesis pathways or the improvement of existing routes using biological catalysts as part of an Eco-Design approach. Costly and less environmentally friendly chemical steps can be replaced by using biological catalysts. The internship focused on optimising biocatalyst extraction and purification processes.

On the one hand, lysis process using a microfluidizer has been studied. In the laboratory, lysis efficiency is assessed by comparing microscopic observations before and after lysis. A quantitative measurement was necessary in order to quantify the effectiveness of lysis and to compare the different conditions assessed. A design of experiments approach was chosen in order to determine the conditions under which lysis efficiency is maximised. The influence of each factor on lysis efficiency was determined thanks to this approach, as well as some lysis conditions that appear to be optimal. Yet, lysis efficiency cannot be dissociated from enzymatic activity. Indeed, conditions enhancing lysis may lead to enzymatic degradation. A balance between these two parameters must be found. Enzymatic activities have been assessed in lysates from some lysis conditions, then in purified solutions for the best conditions.

On the other hand, a buffer exchange step has been set up on AKTA. The current purification process is composed of two steps: an affinity chromatography and a buffer exchange. The buffer exchange is carried out manually using single-use columns. In order to reduce the cost of this step both in terms of materials and human resources, it was decided to implement it on AKTA and then optimize it.

Justine  
DUWER

Classique

T-KNIFE GMBH

13125 BERLIN • ALLEMAGNE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Cécile AUGEREAU

3/27/2023 → 9/22/2023

Développement d'un processus sur mesure pour le produit TCR-T de T-knife

Development of a tailored process for T-knife TCR -T product

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

TCR, Thérapie cellulaire, Développement de procédés, Mémoire précoce, Traitement tumeurs solides

TCR, Cell therapy, Process development, Early Memory, Solid tumor treatment

Suzon  
FERME

Classique

L'objectif de ce stage était de développer un processus sur mesure pour la production du produit TCR- T de thérapie cellulaire de T-knife pour le traitement des tumeurs solides. Les données cliniques ont démontré une réponse plus durable lorsque le produit perfusé contient une proportion élevée de cellules TCR-T moins différenciées. Plusieurs composés décrits dans la littérature comme produisant des cellules T moins différenciées ont été testés. Le processus de sélection avait pour objectif de déterminer le composé produisant des cellules T à phénotype mémoire avec une prolifération suffisante pour atteindre des rendements cellulaires satisfaisants. Des paramètres ont été sélectionnés pour évaluer si les critères du Target Drug Profile (TDP) étaient remplis.

Une approche en entonnoir a été utilisée pour cribler les différents composés à des concentrations multiples et à différents moments d'ajout. Dans un premier temps, un criblage visant à titrer tous les composés a été effectué, et la deuxième étape a consisté à sélectionner le bon moment pour l'ajout. Pour distinguer les conditions, nous avons effectué différentes analyses : comptage et viabilité des cellules, tri des cellules activées par fluorescence (FACS), essai de destruction de cellules cancéreuses et expériences Seahorse, afin d'évaluer à la fois les paramètres du processus et du produit.

Les résultats ont montré que tous les composés testés avaient un impact sur le phénotype cellulaire et favorisaient une augmentation du phénotype mémoire dans les cellules T, tout en n'ayant pas d'impact sur la viabilité ou le pouvoir de destruction des cellules T modifiées. Les deux cribles présentés dans ce rapport ont permis de réduire les conditions à deux composés spécifiques, avec deux concentrations chacun, et trois moments différents d'ajout dans le processus. Ces conditions ont été sélectionnées sur la base des paramètres du TDP définis en amont des expériences. D'autres criblages seront effectués pour choisir la condition optimale pour le processus final. Le processus optimisé sera ensuite transféré au département de chimie, de fabrication et de contrôle (CMC) pour être testé à l'échelle industrielle.

The objective of this internship was to develop a tailored process for production of T-knife's TCR-T cell therapy product for the treatment of solid tumours. Clinical data have demonstrated increased response durability when the infused product contains high proportion of early-differentiated TCR-T cells. Several compounds described in the literature to result in less-differentiated T cells were tested during the process to select the compound resulting in T cells with early-memory phenotype with sufficient proliferation to reach satisfactory cell yields. Parameters were selected to assess whether the target product profile criteria were met.

A funnel approach was used to screen different compounds in multiple concentrations, and time points of addition. First, a screen aimed at titrating all compounds was performed, and the second step looked at selecting the right time point for addition. To discriminate the conditions, we conducted different analyses: cell counting and viability, fluorescence activated cell sorting (FACS), killing assay and Seahorse experiments, to assess both process and product parameters.

Results showed that all compounds tested did have an impact on the cell phenotype and promoted an increased memory-like behaviour in the T cells, while not impacting the viability or killing potency of the engineered T cells. The two screens presented in this report allowed a narrowing down of the conditions to two specific compounds, with two concentrations each, and three different time point of addition in the process. Those conditions were selected based on the target product profile parameters defined prior to the experiments. Further screens will be carried out to decide on one optimized condition for the final process. The optimised process will then be transferred to the Chemistry Manufacturing and Control (CMC) department to be tested at a manufacturing scale.

CENTRE D'INFECTION ET D'IMMUNITÉ DE LILLE - 1019 UMR9017

LILLE • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Arnaud MACHELART

3/1/2023 → 8/31/2023

Influence de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* sur les capacités de l'hôte à contrôler une surinfection virale

Influence of *Mycobacterium tuberculosis* infection on the host's capacities to control a viral superinfection

Rapport confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Tuberculose, SARS-CoV-2, co-infection, inflammation, microscopie à haut contenu

Tuberculosis, SARS-CoV-2, co-infection, inflammation, high content microscopy

Joan  
FINE

Mobilité

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) est une bactérie causant chaque année 10 millions de nouveaux cas de tuberculose (TB). Selon les estimations, 25% de la population mondiale serait porteuse de sa forme asymptomatique dite latente. Cette forme latente pouvant durer toute la vie, les personnes infectées seront nécessairement confrontées à d'autres agents infectieux. Ainsi, dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2, il est pertinent d'étudier l'impact de la co-infection avec Mtb sur les capacités de l'hôte à contrôler l'agent infectieux. Au cours d'expérimentations préliminaires, un phénotype de protection par Mtb contre les surinfections virales par SARS-CoV-2 a été observé chez la souris. Ainsi, au cours de ce projet, les poumons prélevés ont été analysés par RTqPCR afin d'évaluer les différences d'expression cytokinique chez les souris mono- et co-infectées par Mtb et SARS-CoV-2, et ainsi décrire l'environnement pulmonaire.

Un modèle de co-infection in vitro par Mtb et le SARS-CoV-2 sur les cellules épithéliales A549 exprimant le récepteur ACE2 a également été mis en place. De manière similaire aux résultats obtenus in vivo, la pré-infection de cellules épithéliales A549 par Mtb protège significativement les cellules de l'infection par le SARS-CoV-2. À partir des images générées par microscopie automatisée à haut contenu, le pourcentage de cellules co-infectées et infectées par Mtb ou le virus a été déterminé et les mécanismes responsables du phénotype ont été investigués.

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is a bacterium causing 10 million tuberculosis (TB) cases each year. It is estimated that 25% of the world population carries an asymptomatic form of TB, known as latent TB. This form can be lifelong, that is why the risk for a patient to contract a superinfection by another pathogen is high. In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, it is relevant to study the effect of co-infections with Mtb on the host's capacities to control the infectious agent. During preliminary experiments, a protection phenotype by Mtb on superinfections by SARS-CoV-2 had been observed on mice. During this project, lung samples collected during these experiments were analysed by RTqPCR to assess the differences in cytokine expression within mice mono- and co-infected by Mtb and/or SARS-CoV-2, and thus describe the pulmonary environment. An in vitro model of co-infection by Mtb and SARS-CoV-2 was also developed. Similar to the results obtained in vivo, pre-infection of A549 epithelial cells with Mtb significantly protects the cells from SARS-CoV-2 infection. From images generated by high-content automated microscopy, the percentage of infected cells was determined, and the mechanisms responsible for the phenotype were investigated.

Institut de Recherches Servier

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Sophie TURBAN-RAJAONAH

Détermination d'effets anti-tumoraux de glues moléculaires IMiD par criblage phénotypique : Développement d'essais pour l'identification de néosubstrats de E3 ubiquitine ligase

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Culture cellulaire / Pharmacologie / Études d'interactions in vitro / Biochimie / Criblage

Les petites molécules induisant la dégradation de protéines cibles par le système ubiquitine-protéasome représentent une nouvelle approche dans la conception de médicaments pour lutter, entre autres, contre le développement du cancer, de maladies inflammatoires et neurodégénératives. Les Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs) qui lient de façon covalente une protéine d'intérêt à une E3 ubiquitine ligase sont l'exemple le plus courant dans ce domaine. Récemment, les glues moléculaires sont apparues dans le domaine de la dégradation de protéines comme étant une nouvelle classe d'agents thérapeutiques avec des mécanismes d'action entièrement nouveaux et de nouvelles activités. Lorsque les glues se lient aux E3 ligases, elles entraînent la modification de leur surface, induisant ainsi l'ubiquitination, l'adressage au protéasome puis la dégradation de néosubstrats. Ceux-ci sont en lien direct ou indirect avec le développement de pathologies telles que certains cancers. Ainsi leur dégradation a un impact favorable sur la résolution de ces maladies. Les petites molécules immunomodulatrices, les IMiDs, sont à l'heure actuelle les glues les plus étudiées dans la lutte contre le cancer du sang. Elles se lient à la E3 ligase Céréblon afin de déclencher le recrutement et la dégradation de nombreux néosubstrats comme IKZF1 et IKZF3 impliqués dans le développement du myélome multiple.

L'efficacité prouvée de ces molécules pousse la recherche pharmaceutique à identifier de nouveaux composés IMiDs pour le traitement de cancers difficiles à soigner comme les tumeurs solides. Préalablement au stage, un criblage phénotypique d'efficacité anti-proliférative de composés a été réalisé sur un panel de lignées cellulaires humaines cancéreuses provenant de différents types tissulaires. L'objectif du projet de stage est, d'une part, de valider les résultats du criblage sur les lignées cellulaires d'intérêt et vérifier l'efficacité de dégradation du/des composé(s) IMiDs. D'autre part, de développer un test d'immunoprécipitation de protéines pour les futurs tests à mener en spectroscopie de masse. Cette technologie permettra la caractérisation par protéomique des néosubstrats après détermination des IMiDs actives issues du criblage.

Ce projet fera avancer notre compréhension sur les interactions moléculaires enzyme-substrat et aidera à la prise de décisions importantes quant à la direction du programme de recherche.

GIF-SUR-YVETTE • FRANCE

4/17/2023 → 9/22/2023

Determination of antitumoral effect of IMiD molecular glues by phenotypic screening: Development of assays for the identification of E3 ubiquitin ligase neosubstrates

Cell culture / Pharmacology / In vitro interaction studies / Biochemistry / Screening

Small molecules that induce the degradation of target proteins by the ubiquitin-proteasome system represent a new therapeutic approach to fight against the development of cancer, inflammatory and neurodegenerative diseases. Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs), which covalently bind a protein of interest to an E3 ubiquitin ligase, are the most common example in this field. Recently, molecular glues have emerged in the field of protein degradation as a new class of therapeutic agents with entirely new mechanisms of action and novel activities. When glues bind to E3 ligases, they cause modification of the ligase surface inducing ubiquitination, addressing to the proteasome and then degradation of neosubstrates. These neosubstrates are directly or indirectly linked to the development of pathologies such as certain cancers. Their degradation thus has a favorable impact on the resolution of these diseases. Small immunomodulatory molecules, IMiDs, are currently the most studied glues in the battle against blood cancer. They bind to Cereblon E3 ligase to trigger the recruitment and degradation of numerous neosubstrates such as IKZF1 and IKZF3 involved in the development of multiple myeloma.

The proven efficacy of these molecules is driving pharmaceutical research to identify new IMiDs compounds for the treatment of difficult-to-treat cancers such as solid tumors, which remain a major challenge. Prior to the internship, a phenotypic screening was carried out on a panel of human cancer cell lines from different tissue types. The aim of the internship project is, firstly, to validate the screening results on the cell lines of interest and verify the degradation efficiency of the compound(s). Secondly, to develop a protein immunoprecipitation assay for future mass spectroscopy tests. This technology will support proteomic characterization of neosubstrates after determination of active IMiDs issued from screening.

This project will advance our understanding of molecular enzyme-substrate interactions and help make important decisions about the direction of the research program.

Sacha  
GENTNER

Classique

EVONIK (SEA) PTE LTD

138567 • SINGAPOUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Jennifer BOURLAND

4/10/2023 → 9/27/2023

Développement et caractérisation de modèles de peau pigmentés

Development and characterization of pigmented skin models

Rapport confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Modèles de peau 3D in vitro, culture cellulaire, ingénierie tissulaire, pigmentation, mélanocytes

In vitro 3D skin model, primary cell culture, tissue engineering, pigmentation, melanocytes

Camille  
JENNY

CBI

La peau, barrière majeure entre le corps et l'environnement extérieur, est largement étudiée pour mieux comprendre l'administration de médicaments, l'application de cosmétiques et les maladies cutanées. Cependant, la représentativité des modèles existants est limitée. En effet, les modèles 2D ne permettent pas de recréer correctement le comportement des cellules, car les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire n'y sont pas représentées. De même, les modèles murins comportent plusieurs différences avec la peau humaine et posent des problèmes éthiques majeurs. À la suite des restrictions imposées par l'Union européenne sur l'utilisation d'animaux pour les essais cosmétiques, des progrès majeurs ont été réalisés dans le développement de modèles de peau 3D. Ces modèles, contenant des fibroblastes et des kératinocytes, recréent le microenvironnement de la peau en permettant la communication entre les cellules du derme et de l'épiderme. Cependant, ces derniers n'intègrent souvent pas de mélanocytes et ne parviennent donc pas à recréer de pigmentation. Or, la pigmentation joue un rôle critique de protection de l'ADN contre les dégâts créés par les rayons ultraviolets, pouvant mener à des cancers de la peau ou au photo vieillissement. Ce stage s'est concentré sur la création d'un modèle 3D de peau pigmentée sans composé animal, qui pourrait ensuite être utilisé pour évaluer l'efficacité de cosmétiques. Pour cela, la culture primaire de mélanocytes a été optimisée, puis le protocole d'Evonik a été modifié afin d'incorporer des mélanocytes dans la couche basale de l'épiderme. Ce protocole a ensuite été optimisé en modifiant le ratio kératinocytes/mélanocytes, le protocole d'ensemencement et le milieu d'alimentation. Enfin, les modèles obtenus ont été caractérisés pour vérifier la présence d'un modèle intègre (derme sain et épiderme stratifié), l'incorporation des mélanocytes dans la couche basale et l'occurrence de la mélanogénèse.

Skin is the largest human organ and acts as a barrier between the internal and the external environment. It is widely studied to better understand drug delivery, topical application of cosmetics and skin-related diseases. However, the physiological relevance of existing models such as 2D skin models or murine models is limited. In fact, 2D models fail to correctly represent cell behaviour, given the significance of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, leading to potential false findings. Similarly, murine models present several dissimilarities with human skin, and pose major ethical concerns. Following the European Union's restrictions on the use of animals for safety assessments, major progress has been made in the development of 3D skin models. These models recreate the skin microenvironment by enabling crosstalk between fibroblasts in the dermis and keratinocytes in the epidermis. However, current skin equivalents often do not incorporate melanocytes, and thus fail to recreate skin pigmentation. Obtaining pigmented 3D skin models is crucial due to the critical role of melanin against ultraviolet radiations-induced DNA damage, skin cancer or photo-ageing. This internship focused on the development of an animal-free pigmented 3D skin model that could subsequently be used for evaluating cosmetics safety and efficacy. For this purpose, the primary culture of melanocytes was optimized to obtain enough cells. Then, Evonik's existing protocol was modified to incorporate melanocytes in the basal layer of the epidermis. This protocol was then optimized by focusing on several parameters, including the keratinocytes-to-melanocytes ratio, the seeding protocol, and the culture conditions (media, supplements) Finally, the obtained models were characterized to verify skin integrity (presence of a healthy dermis and a stratified epidermis), the successful incorporation of melanocytes in the basal layer and the occurrence of melanogenesis.

ASGARD THERAPEUTICS AB

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Fabio FABIO FIUZA ROSA

LUND • SUEDE

3/27/2023 → 9/22/2023

Establishing upstream and downstream processes for the manufacturing of adenoviral vectors for reprogramming-based cancer immunotherapy.

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Gene therapy, direct reprogramming, cDC1, adenoviral vectors, delivery platform, manufacturing, analytical methods

Gene therapy, direct reprogramming, cDC1, adenoviral vectors, delivery platform, manufacturing, analytical methods

Zoe  
 KLEIN

Classique

Les immunothérapies ont révolutionné le moyen de traiter le cancer. Pour autant, la plupart des patients ne répondent pas à ces thérapies en raison de mécanismes d'évasion immunitaire (présentation dysfonctionnelle des antigènes tumoraux, faible infiltration des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au sein de la tumeur). Parmi les CPA, les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) présentes dans les tumeurs sont des acteurs essentiels de l'immunité antitumorale et sont associées à une meilleure survie des patients. Asgard Therapeutics a récemment démontré que la surexpression des facteurs de transcription PU.1, IRF8 et BATF3 (PIB) entraîne la reprogrammation directe de cellules tumorales en cellules fonctionnelles de type cDC1 capables de présenter leurs propres antigènes tumoraux et de mettre en place une immunité antitumorale efficace après leur transfert in vivo. Asgard développe le produit de thérapie génique AT-108, une nouvelle immunothérapie basée sur l'administration in vivo de vecteurs adénoviraux (AdV) codant pour PIB et permettant la reprogrammation in situ des cellules cancéreuses en cellules de type cDC1.

Au cours de ce projet, nous avons développé des procédés upstream, downstream et analytiques pour la production, la purification et la caractérisation des AdV à une échelle R&D. Après la transfection d'AdV-GFP et d'AdV-PIB-GFP dans des cellules compétentes HEK293, l'augmentation de la fréquence de cellules GFP+ au fil du temps ainsi qu'un effet cytopathique dans les 6 jours témoignent de la bonne génération du stock primaire d'AdV. Après 3 cycles d'amplification du stock primaire, les AdV ont été purifiés et concentrés par 2 cycles d'ultracentrifugation en gradient de densité sur C1Cs suivie d'une dialyse. Les AdV ont été évalués par quantification du titre infectieux et du niveau d'agrégation, et leur fonctionnalité par quantification en cytométrie en flux de la reprogrammation cellulaire de la lignée cancéreuse de référence T98G. Nous avons également observé une diminution de l'efficacité des AdV de 50 % après 7 jours de stockage à 4°C ou après 3 cycles de congélation-décongélation, soulignant l'importance de conserver les AdV à -80°C afin de maintenir leur performance.

A terme ce travail aidera à définir les bonnes pratiques de fabrication et les spécifications du vecteur AT-108 requises pour les essais cliniques.

Immunotherapy has revolutionized cancer treatment. However, most patients do not respond to these therapies due to immune evasion mechanisms including dysfunctional tumor antigen presentation and low infiltration of antigen presenting cells (APCs). Among APCs, conventional type 1 dendritic cells (cDC1) in tumors are key drivers of anti-tumor immunity and associate with better patient survival. Recently, Asgard Therapeutics demonstrated that overexpression of the transcription factors PU.1, IRF8 and BATF3 (PIB) drives cell fate reprogramming of tumor cells into functional cDC1-like cells able to present their own tumor' antigens to T cells and mount effective anti-tumor immunity after in-vivo transfer. To circumvent ex-vivo cell manipulation challenges, Asgard is developing AT-108, a novel immunotherapy based on the in-vivo delivery of PIB-encoding adenoviral vectors (AdV) allowing in situ reprogramming of cancer cells to cDC1-like cells.

Here, we developed upstream, downstream and analytical methods to produce, purify, and characterize AdVs at a laboratory scale. Upon transfection of AdV-GFP and AdV-PIB-GFP into packaging HEK293 cells, we observed increasing frequencies of GFP+ cells overtime and cytopathic effect within 6 days, suggesting successful generation of primary AdV stocks. After 3 amplification rounds of the primary stock, AdV were purified and concentrated by 2 rounds of caesium chloride density gradient ultracentrifugation followed by dialysis. Quality of AdV was evaluated by quantification of infectious titer and AdV aggregation, and potency by flow cytometry quantification of reprogramming in T98G reference cancer cells. In addition, we observed that AdV potency decreases 50% when stored at 4°C for 7 days or when subjected to 3 freeze-thaw cycles, highlighting the importance of storing AdV at -80°C to maintain virus potency.

Together, this work will help defining the manufacturing practices and specifications of AT-108 vector required for clinical trials.

PEP-THERAPY - Gustave Roussy

VILLEJUIF • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Diego GERMINI

3/6/2023 → 9/4/2023

Étude translationnelle pour la recherche de biomarqueurs prédictifs et de nouvelles indications thérapeutiques pour PEP-010

Translational study for the research of predictive biomarkers and of novel therapeutic indications for pep-010

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Oncologie, apoptose, peptide, biomarqueurs, nouvelles indications thérapeutiques

Oncology, apoptosis, peptide, biomarkers, new therapeutic indications

Aline  
LACROIX

Mobilité

L'apoptose ou mort cellulaire programmée permet le maintien de l'équilibre avec la division cellulaire. La formation de cellules cancéreuses est souvent la conséquence d'un défaut dans la voie apoptotique, ainsi « réapprendre à la cellule à mourir » est une stratégie exploitable pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. C'est en se basant sur ce concept que PEP-Therapy, une biotech parisienne développant des peptides servant comme thérapie ciblée en oncologie, a développé PEP-010. PEP-010, actuellement évalué en essai Clinique de phase I sur des tumeurs solides, est un peptide pro-apoptotique designé spécifiquement pour pénétrer et rompre l'interaction entre la phosphatase PP2A et la Caspase 9 (deux protéines clés dans la voie apoptotique). L'action de PEP-010 libère les deux protéines ce qui rétabli leurs fonctions et restaure donc l'apoptose dans les cellules cancéreuses.

Travaillant dans une démarche translationnelle entre la pré-clinique et la clinique, un des objectifs de PEP-Therapy est de trouver des biomarqueurs exploitable en clinique liés à PEP-010 permettant de discriminer en amont les patients éligibles au traitement avec PEP-010. C'est dans ce cadre que s'est inscrit mon stage de fin d'études. L'objectif premier visait au développement de candidats en tant que biomarqueurs prédictifs qui pourront être détectable rapidement et de façon simple en routine hospitalière. Le second objectif était la recherche de nouvelles indications thérapeutiques pour PEP-010 et l'investigation de son mécanisme d'action sur ces tumeurs.

Apoptosis is the programmed cell death, and it allows to keep the balance with cell division. Impairments in cellular apoptosis pathway is often at the basis of transformation into cancer cell, thus "re-teaching the cell to die" is an exploitable strategy for developing novel anticancer therapy. Based on this concept, PEP-Therapy, a Paris-based biotech company developing first-in-class peptides as targeted therapies for oncology, developed PEP-010. PEP-010, currently evaluated in clinical phase I for metastatic solid tumors, is a pro-apoptotic peptide specifically designed to bind and disrupt the complex between phosphatase PP2A and Caspase 9 (two key proteins of the apoptotic pathway). PEP-010 action allows the liberation of these two proteins leading to restoration of their normal functions and allowing the re-establishment of apoptosis in cancer cells. Working in a translational way between pre-clinical and clinical studies, a goal for PEP-Therapy is to find biomarkers linked to PEP-010 allowing patient selection for treatment with PEP-010. It is within this context that my internship took place. The first objective was to find candidate predictive biomarkers that can be easily and quickly detectable in hospital routine. The second objective was to search for new therapeutic indication and to investigate PEP-010' mechanism of action in these tumors.

## EXOTHERA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Thomas BOUCKENOOGHE

Faisabilité, montée en échelle et optimisation de la production de VLP par une lignée stable de HEK293 en bioréacteur en suspension et en adhérence

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Bioréacteur, culture cellulaire, suspension, adhérence, optimisation

Exothera est l'une des quatre filiales du groupe Univercells, dont l'objectif est de faciliter l'accès aux médicaments dans le monde entier à des coûts réduits. Exothera est une entreprise de sous-traitance (CDMO) spécialisée dans les thérapies géniques et cellulaires basées sur des vecteurs viraux. J'ai effectué mon stage au sein de l'équipe USP en R&D et plus précisément sur un projet externe pour un client. Le client visait à utiliser sa lignée stable HEK293 en suspension pour fabriquer des eVLPs. Le défi initial consistait à adapter le processus à partir de ShF à des bioréacteurs, et à comparer la croissance cellulaire et la productivité des VLP dans un bioréacteur en suspension (BioBLU) et un bioréacteur à lit fixe (Scale-X Hydro). La performance du processus impliquait une surveillance continue de la croissance cellulaire et du métabolisme, ainsi qu'une analyse des GAG et de Spike grâce à la méthode ELISA. La deuxième phase de ce projet consistait à optimiser le processus dans 2 bioréacteurs à lit fixe ScaleX Hydro en parallèle. Cette optimisation visait à améliorer la croissance cellulaire et la production de VLP, en prolongeant la période de production de 6 à 20 jours. Deux types de milieux ont été choisis, incluant des remplacements de milieux et des changements de milieux, et des modifications ont été apportées pour fournir des nutriments afin de potentiellement stimuler la croissance cellulaire et la production de VLP.

Sarah  
LAMBERT

Mobilité

6040 CHARLEROI • BELGIQUE

3/6/2023 → 9/1/2023

Feasibility, scale up and Optimization of an eVLP production process using stable suspension HEK293 cell line in suspension and fixed bed bioreactors.

Cell culture, suspension, adherence, bioreactors, optimization

Exothera is one of the four subsidiaries of the Univercells group, whose objective is to facilitate access to drugs worldwide at reduced costs. Exothera is a Contract Development Manufacturing Organization (CDMO) specialized in gene and cell therapies based on viral vectors. I did my internship in the Upstream Development team in R&D and more specifically on an external project for a client. The client aimed to utilize their stable HEK293 lineage in suspension to manufacture eVLPs. The initial challenge involved adapting the process from shake flasks to bioreactors and to compare cell growth and VLP productivity in a suspension bioreactor (BioBLU) and a fixed-bed bioreactor (Scale-X Hydro). The performance of the process involved continuous monitoring of cell growth and metabolism and GAG and Spike analysis thanks to ELISA method. The second phase of this project involved optimizing the process in 2 ScaleX Hydro fixed-bed bioreactors in parallel. This optimization aimed to improve cell growth and VLP production, extending the production period from 6 to 20 days. Two types of media were chosen, incorporating medium replacements and medium change, and making modifications to provide nutrients to potentially boost cell growth and VLP production.

## SANOPI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Camille JOURDAN

Optimisation du pré-assemblage de réactifs pour la synthèse de l'ARN in vitro et la synthèse de la coiffe dans la production de vaccins

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Vaccin ARN, Production, In vitro transcription, capping, optimisation, prémélanges, Scale-up, cadre industriel

Suite à l'incroyable développement du vaccin contre le covid-19 utilisant la technique de l'ARN messenger, les plateformes de vaccins à ARNm ont démontré leur potentiel. C'est pourquoi Sanofi, une entreprise pharmaceutique internationale spécialisée dans la santé publique et les traitements innovants, a investi des millions d'euros dans la création d'un centre d'excellence ARN et dans la construction d'une nouvelle plateforme de production de vaccins. L'objectif est de produire dès 2025 six candidats de vaccins à ARNm.

Dans ce contexte d'industrialisation du procédé de production d'ARN pour les vaccins, il est essentiel d'optimiser toutes les étapes. En effet, la préparation des réactions d'IVT et de capping peut être optimisée pour réduire la durée de préparation et le risque d'anomalie en lien avec des erreurs d'exécution. Pour pallier cela, le pré-assemblage et la standardisation des quantités de réactifs permettrait de réduire le nombre de lignes d'entrée dans les bioréacteurs et à diminuer ainsi le temps nécessaire sur le chronogramme de production.

La composition de différents mélanges de réactifs et leur stabilité a été évalué vis-à-vis de leur impact sur la quantité et la qualité des ARNm produits à différentes échelles allant de 2 ml à 5L.

Ainsi cette démarche d'optimisation vise à accélérer l'industrialisation d'un procédé de production de vaccins ARNm robuste, tout en garantissant la qualité et la sécurité des produits.

## MARCY L'ETOILE • FRANCE

3/6/2023 → 9/1/2023

Reagent premix optimization for In Vitro RNA synthesis and capping reaction in vaccine production

RNA Vaccine, Production, In vitro transcription, capping, optimization, premixes, Scale-up, industrial framework

After the remarkable progress made in developing the COVID-19 vaccine using messenger RNA technology, mRNA vaccine platforms have proven to be highly promising. As a result, Sanofi, a leading international pharmaceutical company specializing in public health and innovative treatments, has made substantial investments in establishing an RNA center of excellence and constructing a state-of-the-art vaccine production platform. The primary objective is to produce six mRNA vaccine candidates by 2025.

Given the ongoing industrialization of the RNA production process for vaccines, it is imperative to optimize every stage. Indeed, the preparation of IVT and capping reactions can be optimized to reduce preparation time and the risk of deviations linked to execution errors. To achieve this, pre-assembly and standardization of reagent quantities can significantly decrease the number of entry lines into the bioreactors, ultimately reducing the time needed in the production schedule.

The composition of different reagent mixtures and their stability were evaluated in terms of their impact on the quantity and quality of mRNAs produced at different scales, from 2 ml to 5L.

The aim of this optimization approach is to accelerate the industrialization of a robust mRNA vaccine production process, while guaranteeing product quality and safety.

Lucie  
LAMBERT

Mobilité

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Cornelia ZIEGLER

Comparaison in vitro de différents nouveaux formats de drug conjugués sur des modèles sphéroïdes

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Immuno-oncologie, Culture Cellulaire, Sphéroïdes, Drug Conjugués, Viabilité Cellulaire

Le groupe de recherche en immuno-oncologie que j'ai rejoint est spécialisé dans le développement de thérapies ciblées. Un pilier de la stratégie de Sanofi est le développement de nouveaux formats de drug conjugués qui ont été développés à la suite des Antibody Drug Conjugates (ADCs).

Les nouveaux formats de drug conjugués sont des molécules modifiées, ressemblant au format des IgG, conjuguées à la drogue qui est dans notre cas cytotoxique. Le compound d'intérêt se lie à sa cible exprimée sur les cellules cancéreuses et peut donc, après internalisation, délivrer spécifiquement le payload aux cellules tumorales. Ainsi, l'exposition systémique et les effets secondaires sont limités en comparaison avec des traitements non ciblés comme la chimio ou radio-thérapie. Il existe différents variants de tailles pour ces nouveaux formats de conjugués. Toutefois, leur masse moléculaire est inférieure à celle des ADCs qui est au minimum de 150 kDa. Par conséquent, ces nouveaux conjugués devraient théoriquement avoir une meilleure pénétration et une distribution plus homogène dans les tumeurs solides grâce à leurs tailles.

Le but du projet est de développer un test in vitro permettant un screening plus précis des molécules d'intérêt et de déterminer s'il existe une différence entre les ADCs et les nouveaux formats de drug conjugués, en comparant des modèles 2D et 3D. En effet, les modèles 3D comme les sphéroïdes sont plus complexes puisque qu'ils possèdent plusieurs couches de cellules avec des jonctions serrées, modifiant ainsi l'exposition des cellules au traitement, grâce à la pression et au gradient créés. Ce projet permettra également d'évaluer si la pénétration des compounds dans des sphéroïdes est prédictive du modèle in vivo.

Pour développer les sphéroïdes, j'ai sélectionné différentes lignées tumorales avec des niveaux d'expression de la cible différents. Une fois établis, ils ont été traités, en parallèle des modèles 2D, avec les différents compounds étudiés. Nous avons pu mettre en avant des différences entre les deux modèles mais, dans le cadre des modèles 3D, aucune différence significative entre les compounds n'a été relevé. Par la suite, la structure des sphéroïdes a été étudié par immunofluorescence en marquant un marqueur de prolifération et un marqueur de jonctions serrées. Finalement, nous optimisons actuellement notre protocole afin d'observer la pénétration de certains nouveaux conjugués par fluorescence.

VITRY SUR SEINE • FRANCE

3/6/2023 → 8/25/2023

In vitro comparison of novel formats of drug conjugates on 3D Spheroids cell culture models.

Immuno-oncology, Cell Culture, Spheroids, Drug Conjugates, Live Cell Analysis

The immune-oncology research group that I joined during my end-of-study internship is specialized in the development of targeted therapy. Part of Sanofi's strategy is the development of novel formats of drug conjugates that have been developed after the Antibody Drug Conjugates (ADCs). Novel formats of drug conjugates are engineered molecules, to which a drug is conjugated. In our case, the conjugate is composed of an IgG-like format with a cytotoxic payload. The conjugate can bind to its target expressed by cancer cells and specifically deliver the drug to cancer cells. Therefore, systemic exposure and side effects can be reduced compared to non-targeted therapy, such as chemo or radiotherapy. Even if different conjugates' size variants exist, their molecular weight is lower than ADCs, which is at least 150 kDa. So, novel formats of drug conjugates should have a better penetration and a homogeneous distribution in solid tumors thanks to their size.

The aim of the project is to develop an in vitro test to have a better differentiation of the compounds during screenings and determine whether there is a difference between ADCs and novel formats of drug conjugates or not, by comparing 2D and 3D models. Indeed, 3D models such as spheroids are more complex as they consist of many cell layers with tight junctions. Therefore, the cell exposure to treatments is modified because of the created intraspheroidal pressure and concentration gradient. This project is also evaluating whether the spheroids penetration is predictive of the in vivo models.

To develop the 3D models, I selected cell lines with different levels of target expression. Once the 3D models have been established, they have been treated, as well as the 2D models, with the studied compounds. We demonstrated differences between the 2D vs 3D models, but no significant differences between the compounds were highlighted. Then, the structures of spheroids were studied by immunofluorescence thanks to the staining of proliferation and tight junctions markers. Currently, we are optimizing our protocol to monitor the penetration of some novel conjugates by fluorescence.

Camille  
LE GOUALLEC

Classique

BIOMERIEUX SA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Nadège GOUTAGNY

Evidence generation and dissemination IA

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Marketing / Support de preuve scientifique / Analyse concurrentielle / Diagnostic in vitro / Test immunologique

J'ai réalisé mon stage de fin d'étude au sein de l'équipe global marketing Immunologique chez bioMérieux au siège social à Marcy l'étoile. J'ai travaillé autour du projet « Génération et dissémination de support de preuve aux produits de la gamme des tests immunologiques ». L'objectif de ce projet est de soutenir la gamme Immunologique en facilitant et en améliorant l'accès à des preuve appropriées pour les parties prenantes de l'entreprise. Mon projet s'est organisé en trois grandes parties. La première partie de mon stage concernait la réorganisation de Showpad, qui est la plateforme numérique utilisée pour partager les supports de preuve. Cette réorganisation a impliqué la proposition d'une nouvelle structure de fichiers au sein de la plateforme Showpad ainsi que l'établissement d'un modèle pour attribuer des titres aux différents documents. L'objectif était d'homogénéiser la structure des noms pour simplifier l'utilisation de ces documents par les forces de vente. La seconde partie de mon stage s'est concentrée sur une analyse approfondie des supports de preuve actuellement disponible sur cette plateforme suivie d'une présentation à tous les chefs de produits et tous les représentants marketing des régions. Ces présentations avaient pour but de recueillir leur point de vue sur la nouvelle organisation proposée et sur les lacunes potentielles en termes d'évidence scientifique. Cela a permis d'identifier des documents manquants et de prioriser les futurs documents à produire. De cette analyse a découlé la dernière partie de mon stage qui consistait à générer de nouveaux supports de preuve. J'ai donc pu créer des Key Paper Summary, qui sont des résumés d'articles ou de données internes en 1 page, pour les produits VIDAS® D-DIMER et VIDAS® NT-proBNP2. Et le dernier document que j'ai développé était une analyse concurrentielle, ce document devait être généré afin de supporter le lancement d'un nouveau produit de bioMérieux, prévu pour fin Septembre 2023. Ce stage a donc eu une forte connotation marketing tout en appliquant mes connaissances scientifiques notamment pour la génération de nouveaux supports de preuve scientifiques.

Lucas  
MAGIMEL

Classique

MARCY L'ETOILE • FRANCE

3/20/2023 → 9/15/2023

Evidence generation and dissemination IA

Marketing / Supporting scientific evidence / Competitive analysis / In vitro diagnostics / ImmunoAssay

I completed my final internship within the Immunoassay Global Marketing team at bioMérieux's headquarters in Marcy l'Étoile. I worked on the project "Generation and Dissemination of Evidence-based Support for the Immunological Testing Product Line." The objective of this project is to support the Immunology product line by facilitating and enhancing access to appropriate evidence for the company's stakeholders. My project was organized into three main parts. The first part of my internship focused on the reorganization of Showpad, the digital platform used to share evidence-based support materials. This reorganization involved proposing a new file structure within the Showpad platform and establishing a template for assigning titles to different documents. The goal was to standardize the naming structure to simplify the use of these documents by the sales teams. The second part of my internship involved a comprehensive analysis of the currently available evidence-based support materials on this platform, followed by a presentation to all product managers and marketing representatives from various regions. These presentations aimed to gather their perspectives on the proposed new organization and potential gaps in scientific evidence. This process helped identify missing documents and prioritize future document generation. Based on this analysis, the final part of my internship focused on generating new evidence-based support materials. I was able to create Key Paper Summaries, which are one-page summaries of articles or internal data, for the VIDAS® D-DIMER and VIDAS® NT-proBNP2 products. The last document I generated was a competitive analysis, intended to support the launch of a new bioMérieux product scheduled for the end of September 2023. This internship had a strong marketing emphasis while also applying my scientific knowledge, particularly in generating new scientific evidence-based support materials.

## MERCK BIODEVELOPMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Marianne PORTEFAIX

Participation au lancement d'une unité de production de MABs et protéines recombinantes

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Production, USP, GMP, polyvalence, amélioration continue, gestion de stock, rédaction de protocoles de validation et de Batch record, contrôle qualité, CDMO

Ce stage s'est déroulé dans le cadre d'un lancement d'une nouvelle unité de production commerciale dans un bâtiment neuf livré en octobre 2022. J'ai donc pu assister à la fin des qualifications des salles et des équipements et aux deux premiers lots de production d'une enzyme recombinante, une hyaluronidase, dont l'intérêt thérapeutique est d'être utilisée pour faciliter l'absorption d'autres médicaments par injection sous cutanée. Mon rôle a été très varié, j'ai pu travailler sur la rédaction de protocoles et de rapports de validation et la rédaction de Batch Records (documents qui regroupent toutes les actions à réaliser et valeurs à reporter sur une étape d'un projet). Je me suis aussi familiarisée avec les règles GMP et qualité en réalisant l'audit des logbooks d'équipement et des documents de production. J'ai également travaillé pour l'ensemble du service de production sur de l'amélioration continue et j'ai eu la charge de la gestion des montages utilisés en production en lien avec un autre bâtiment du site.

MARTILLAC • FRANCE

2/13/2023 → 8/4/2023

This internship took place during the launch of a commercial production unit in a new building delivered in October 2022. I was therefore able to witness the end of room and equipment qualifications and both of the first batches of production of a recombinant enzyme, a hyaluronidase whose therapeutic interest is to facilitate the absorption of other drugs by subcutaneous injection. My duties were very diversified, I worked on the redaction of validation protocols and reports and of Batch Records (documents that gather all the actions to be performed and values to be recorded during a step of a project). I learned about GMP compliance and quality regulations while auditing the equipment logbooks and production documents. I also worked for the whole production service on continuous improvement and was in charge of overseeing the flexible assemblies supply through a collaboration with another department site.

Maya  
MARIOTTINI

Classique

## POLYPLUS TRANSFECTION

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Claire GUEGUEN

Mise au point d'applications des produits de transfection in vivo

Rapport confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Nanoparticules lipidiques - Lipides cationiques - Biodistribution - Toxicité - Vaccination ARNm

Les nanoparticules lipidiques (LNPs) sont composées de quatre types de lipides : lipides ionisables/cationiques, phospholipides, cholestérol et lipides PEGylés. En raison de leur haute efficacité d'encapsulation et de transfection ainsi que de leur faible cytotoxicité, les LNPs sont de plus en plus utilisées en génie génétique et ont permis de développer ONPATTRO® (patisiran) pour traiter l'amylose transthyréline, approuvé en 2018 par la FDA ainsi que les vaccins à ARNm contre la COVID-19. Les LNPs à lipides ionisables vont davantage s'accumuler dans le foie tandis que les lipides cationiques ciblent les poumons et la rate. La particularité de Polyplus est de mettre à disposition des lipides cationiques pour modifier la biodistribution des LNPs et limiter leur toxicité avec une structure chimique différente des lipides couramment utilisés tels que la DOTAP et la DODMA.

Ma principale mission a été consacrée au développement de la stratégie LNP, de leur formulation et de leur caractérisation jusqu'à leur utilisation en transfection in vivo chez la souris. La première étape a été le criblage sur les compositions et les proportions des différents lipides utilisés. Ensuite, l'effet de la présence de lipide cationique dans des formulations commerciales sur les efficacités de transfection in vitro et in vivo a été évalué. De plus, différents lipides cationiques ont été étudiés pour déterminer la biodistribution des LNP en modifiant les chaînes carbonées liées à la tête polaire et de la queue hydrophobe ainsi que l'impact de linkers sur la transfection in vitro. Enfin, la capacité des formulations lipidiques à produire des anticorps spécifiques a été mesurée chez la souris après vaccination d'ARNm contre la COVID-19.

ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

Lipid nanoparticles (LNPs) are composed of four types of lipids: ionizable/cationic lipids, phospholipids, cholesterol and pegylated lipids. Due to their high encapsulation and transfection efficiency and their low cytotoxicity, LNPs are increasingly used in genetic engineering. They have permitted the development of ONPATTRO® (patisiran) to treat transthyretin amyloidosis approved by the FDA in 2018 and mRNA vaccines against COVID-19. LNPs with ionizable lipids will accumulate more in the liver while cationic lipids target the lungs and the spleen. The particularity of Polyplus is to provide cationic lipids to change the biodistribution of LNPs and limit their toxicity with a different chemical structure of commonly used lipids such as DOTAP and DODMA.

My main mission was to develop the LNP strategy, from their formulation and characterization to their in vivo transfection in mice. The first step was the screening on the compositions and proportions of the different lipids used. Then, the impact of the presence of cationic lipids in commercial formulations on in vitro and in vivo transfection efficiencies was evaluated. In addition, different cationic lipids were studied to determine LNPs biodistribution by modifying carbon chains linked to the polar head and of the hydrophobic tail and the impact of linkers on in vitro transfection. Finally, the ability of lipid formulations to produce specific antibodies was measured in mice after mRNA vaccination against COVID-19.

Maeva  
MARTIN

CP

**BIOMUNEX PHARMACEUTICALS**

PARIS • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Julie PRIGENT

10/3/2022 → 9/29/2023

**Blockage par anticorps de deux checkpoints immunitaires myéloïdes pour augmenter la phagocytose des macrophages associés aux tumeurs**

**Antibody blockade of two myeloid checkpoints to enhance the phagocytosis of tumor associated macrophages.**

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Anticorps bispécifiques, macrophages, points de contrôles immunitaires myéloïdes, phagocytose, immunothérapies

Bispecific antibodies, macrophages, myeloid immune checkpoints, phagocytosis, immunotherapy

Valentine  
 MICHEL

CP

Biomunex Pharmaceuticals, entreprise située à Paris dans l'hôpital Cochin, développe des anticorps multi-spécifiques en immuno-oncologie. Sa plateforme BiXAb permet de produire des anticorps bispécifiques tétravalents à partir des séquences des 2 anticorps monoclonaux. Le succès des anticorps inhibant des checkpoints immunitaires sur les lymphocytes T a ouvert la voie vers l'utilisation de cette approche pour cibler d'autres cellules immunitaires, notamment les macrophages. Ces cellules sont prédominantes dans de nombreuses tumeurs mais reçoivent de multiples signaux dans le microenvironnement tumoral qui les polarisent vers un phénotype immunosuppresseur. Elles vont favoriser le développement de la tumeur et limiter l'activité des cellules immunitaire antitumorales. Les macrophages peuvent perdre leur capacité à phagocyter via le mécanisme d'ADCP due à l'activation de checkpoints immunitaires myéloïdes envoyant un signal « don't eat me ».

Biomunex Pharmaceuticals, based at the Cochin Hospital in Paris, develops multispecific antibodies for immuno-oncology. Its proprietary BiXAb platform enables the production of tetravalent bispecific antibodies from the sequences of 2 monoclonal antibodies.

L'objectif de mon projet était de valider la preuve de concept ciblant 2 checkpoints myéloïdes afin de restaurer la phagocytose des cellules tumorales par les macrophages. Pour cela, j'ai d'abord produit puis purifié plusieurs anticorps monoclonaux ciblant chaque cible. Les anticorps ayant validé les contrôles qualités ont ensuite été caractérisés. Leur capacité à se lier à leur cible et à bloquer son interaction avec la tumeur a été évaluée afin de sélectionner les meilleurs candidats. Puis, j'ai mis en place un essai de phagocytose par FACS et par Incucyte afin d'évaluer leur capacité à renforcer l'ADCP des macrophages. Les meilleures combinaisons pour former plusieurs anticorps bispécifiques ont ainsi pu être sélectionnées. Enfin, ces nouveaux Bixabs ont été produits pour être caractérisés dans les différents essais fonctionnels.

The success of antibodies inhibiting immune checkpoints on T cells has paved the way for using this approach to target other immune cells, notably macrophages. These phagocytotic innate immune cells predominate in many tumors but receive multiple signals in the tumor microenvironment that polarize them towards an immunosuppressive phenotype. Indeed, they promote tumor development and limit the activity of anti-tumor immune cells. The loss of their Antibody Dependent Cell Phagocytosis (ADCP) ability may be due to the activation of their myeloid immune checkpoints, sending a "don't eat me" signal.

The aim of my project was to validate the proof-of-concept demonstrating that blocking 2 myeloid checkpoints can restore phagocytosis of tumor cells by macrophages. To achieve this project, I first produced and purified several monoclonal antibodies targeting each checkpoint. The antibodies that passed quality controls were then characterized. Their ability to bind to their target and block its interaction with the tumor was evaluated to select the best candidates. Next, I set up a FACS and Incucyte phagocytosis assays to assess their ability to enhance macrophage ADCP. The best combinations to form several bispecific antibodies were then selected. Finally, these new Bixabs were produced to be characterized in various functional assays.

NETRIS PHARMA

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

Étapes préliminaires du développement d'un anticorps monoclonal anti-protéine-D à visée thérapeutique anti-tumorale

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Protéine-D, glioblastome, anticorps candidats, anti-tumoral, récepteurs à dépendance

La protéine-D est une protéine de guidage axonal connue pour jouer un rôle dans le développement du système nerveux. Alors que sa fonction dans l'embryogénèse a fortement été étudiée, son rôle dans la progression de certains cancers comme le glioblastome (GBM) vient d'être mis en évidence et reste à confirmer. Le GBM est une tumeur cérébrale affectant les cellules gliales. Les solutions thérapeutiques pour ce cancer de mauvais pronostic sont aujourd'hui insuffisantes. La protéine-D est capable d'interagir avec des récepteurs appelés récepteurs à dépendance sur lesquels NETRISPharma travaille depuis de nombreuses années. Lorsque la protéine-D se fixe à ces récepteurs un signal de survie cellulaire est induit, alors qu'un signal d'apoptose est observé en l'absence de ligand. Dans les cellules de GBM, une augmentation de la protéine-D au niveau ARNm et protéique a été observée. La stratégie thérapeutique de NETRISPharma est de bloquer l'interaction entre la protéine-D et ces récepteurs afin de réinduire l'apoptose des cellules cancéreuses. NETRISPharma souhaite donc développer un anticorps monoclonal anti-protéine-D appelé NP100.

La première partie de ce projet consistait à comprendre le rôle de la protéine-D dans le GBM. Nous avons étudié les interactions entre la protéine-D, la nétrine-1 et les différents récepteurs à dépendance. Nous avons testé l'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine-D dans un modèle de GBM in vitro.

Le deuxième objectif était de poursuivre le développement du NP100. Précédemment, deux clones avaient été obtenus par la méthode d'hybridome et testés à NETRISPharma. Après leur chimérisation (région constante (Fc) humanisée), nous avons déterminé leur affinité pour la protéine-D ainsi que leur potentiel effet anti-tumoral in vitro et in vivo. Des expériences de pharmacocinétique ont également été réalisées pour évaluer leur stabilité in vivo. L'un des deux anticorps candidats a montré des résultats prometteurs pour la suite du projet.

LYON • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

Early stages of the development of an anti-D-protein monoclonal antibody for anti-tumor treatment

D-protein, glioblastoma, antibody drug candidates, anti-tumor, dependance receptors

D-protein is an axon guidance protein known to play a role during the nervous system development. While its function during embryogenesis has been intensively studied, its role in cancer progression, especially glioblastoma (GBM) need additional investigations. GBM are tumors affecting glial cells in the brain. Therapeutical solutions for this poor prognosis cancer are currently limited for patients. D-protein can bind to receptors named dependance receptors, which have been studied in NETRIS Pharma for many years. D-protein binding to these receptors leads to a cellular survival signal, whereas an apoptosis signal is induced in absence of this ligand. In GBM cells, both D-protein mRNA and protein level overexpressions have been observed. NETRISPharma therapeutical strategy is to prevent the binding of D-protein to its receptors to reactivate apoptosis in cancer cells. Thus, NETRISPharma would like to develop an anti-D-protein monoclonal antibody named NP100.

The first part of this project consisted of understanding the role of D-protein in cancer, with a particular focus on GBM. Therefore, we investigated the interactions between D-protein, netrin-1 and several dependance receptors. We assessed the effect of D-protein expression inhibition in in vitro GBM model.

The aim of the second part of this project was to continue the NP100 development. Previously, two anti-D-protein clones have been obtained by hybridoma method and tested at NETRISPharma. After chimerization (Fc constant region humanized), their affinity and potential anti-tumoral effect were determined in vitro and in vivo experiments. Furthermore, pharmacokinetic experiments were performed to evaluate their stability in vivo. One of the antibody candidates showed promising results for the future.

Candice MORIN

CP

## SANOFI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Grégory TRANCHANT

Coordination de production – Unité de production Tétanos

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Production, vaccin, tétanos, anomalie/déviaton de production, investigation, Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), amélioration continue

L'entreprise Sanofi est une multinationale française spécialisée dans la santé humaine. Elle possède plusieurs sites en France, notamment un site situé dans la ville de Marcy-L'Etoile. Ce site est dédié à la production de vaccin et comporte également une plateforme de recherche et développement. J'effectue mon contrat de professionnalisation au sein de l'unité de production chargée de fabriquer l'Anatoxine Tétanique Brute (ATB) et la Protéine Tétanique Purifiée (PTP), deux produits utilisés pour fabriquer les vaccins combinés afin de protéger la population du tétanos.

Après l'obtention de différentes formations professionnelles – propres à SANOFI – et nécessaires avant toute intervention dans une zone à atmosphère contrôlée (ZAC), j'ai occupé le poste de coordinatrice de production. Dans ce cadre, mon rôle principal a été de mener des enquêtes production lors de la détection d'évènement inattendu afin d'assurer leur traitement et de prévenir la récurrence de ces évènements par la mise en place de mesures correctives et préventives. Le traitement d'anomalie est un requis réglementaire inscrit dans les Bonnes Pratiques de Fabrication permettant d'assurer la qualité, la conformité des produits de santé et ainsi la sécurité des patients. C'est également un outil d'amélioration continue pour les industriels permettant d'ajuster le procédé et les pratiques opérationnelles tout au long de la vie du produit afin d'améliorer la productivité de l'unité de production.

Afin d'être en capacité d'apporter une réponse pertinente aux anomalies, il a été nécessaire de comprendre le processus de fabrication des produits et pour cela de se rendre régulièrement en zone de production et d'échanger avec les techniciens et opérateurs de production.

Ce rapport présente l'entreprise Sanofi, les étapes de production de l'ATB et de la PTP ainsi que le processus de traitement d'évènements qualité dans un bâtiment de production, illustré par un cas pratique réalisé durant mon contrat.

## MARCY L'ETOILE • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

Production coordination - Tetanus production unit

Production, vaccine, tetanus, production anomaly/deviation, investigation, Good Manufacturing Practices (GMP), continuous improvement

Sanofi is a French multinational specializing in human health. It has several sites in France, including one in the town of Marcy-L'Etoile. This site is dedicated to vaccine production, and also includes a research and development platform. I am doing my professionalization contract in the production unit responsible for making Crude Tetanus Toxoid (CTT) and Purified Tetanus Protein (PTP), two products used to make combination vaccines to protect the population against tetanus. After completing the various professional training courses - specific to SANOFI - required before working in a controlled atmosphere zone (CAZ), I took up the post of production coordinator. My main role was to carry out production investigations when unexpected events were detected, in order to ensure that they were dealt with and to prevent their recurrence by implementing corrective and preventive measures. Anomaly handling is a regulatory requirement of Good Manufacturing Practice, helping to ensure the quality and conformity of healthcare products, and thus patient safety. It is also a continuous improvement tool for manufacturers, enabling them to adjust their processes and operational practices throughout the product's life cycle, in order to improve production unit productivity.

To be able to provide a relevant response to anomalies, it was necessary to understand the product manufacturing process, and to do this I regularly visited the production area and talked to production technicians and operators.

This report presents the Sanofi company, the ATB and PTP production stages and the process for handling quality events in a production building, illustrated by a case study carried out during my contract.

Lea  
NOMINE

CP

KPMG AVOCAT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Mathilde FRISON

Stagiaire en biotechnologies — Consultant en financement de l'innovation

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Crédit d'Impôt Recherche, Valorisation, Périmètre Technique, Opération de R&D, Dossier technique justificatif, Arthrite Juvenile Idiopathique.

Charlotte  
PETE

Classique

Le Crédit d'Impôt Recherche (CIR) est un dispositif fiscal de soutien aux activités de recherche et de développement (R&D), ayant pour objectif d'aider les entreprises à développer leurs activités en leur permettant de financer jusqu'à 30% de leurs dépenses de R&D, par le biais de remboursements ou de réductions d'impôts. Dans ce contexte, les différentes missions réalisées au cours de mon stage ont principalement eu pour but d'accompagner les entreprises du secteur des biotechnologies tout au long du processus de détermination, de sécurisation et d'obtention du CIR. J'ai eu l'occasion d'aborder non seulement l'aspect technique au travers de l'appréciation de l'éligibilité au CIR des activités conduites par les sociétés ainsi que de leur justification détaillée dans un dossier technique sous la forme d'opération de R&D, mais également les activités de valorisation financière des travaux de recherche et de développement menés par les sociétés. Afin d'illustrer mes différentes missions, le cas pratique de la société « Y », étudiant le rôle des peptidoglycans du microbiote intestinal dans l'arthrite, particulièrement dans l'arthrite juvénile idiopathique, est présenté ci-après. A titre d'introduction, l'ensemble des critères cumulatifs sur lesquels s'appuient l'administration fiscale et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche afin de distinguer les activités éligibles des activités non éligibles au CIR seront rappelés, ainsi que les différentes missions effectuées par le consultant scientifique. En tout état de cause, dans le cadre de la constitution du dossier technique justificatif, j'ai dédié une partie de mon temps à l'analyse de la documentation technique décrivant les activités menées par la société « Y ». Par ailleurs, afin d'établir un état de l'art des connaissances existantes au démarrage des travaux, j'ai réalisé une étude bibliographique. Mes travaux ont permis de mettre en évidence les limites des techniques et méthodes existantes au regard de la résolution des verrous techniques propres à cette opération de R&D. Enfin, dans le cadre de mes activités de valorisation financière, j'ai réalisé l'analyse de l'éligibilité de nombreuses factures de sous-traitance éditées par des organismes de recherche agréés au titre du Crédit d'Impôt Recherche.

COURBEVOIE • FRANCE

3/6/2023 → 9/1/2023

Research Tax Credit, Financial Valuation, Technical Scope, Supporting Technical File, Juvenile Idiopathic Arthritis

The Research Tax Credit (RTC) is a tax system that supports research and development activities (R&D). Its objective is to foster the development of such activities by allowing them to finance up to 30% of their R&D expenses through reimbursements or tax reductions. In this regard, the numerous tasks completed during my internship were mostly focused on assisting biotechnology companies throughout the process of identifying, securing and obtaining the RTC. I had the opportunity to work on the technical aspect through the evaluation of the R&D activities' eligibility for the RTC and the drafting of detailed supporting technical files. I also had the chance to address the financial aspects of the aforementioned research and development activities. The practical case of firm "Y," which is researching the role of peptidoglycans of the intestinal microbiota in arthritis, particularly in juvenile idiopathic arthritis, is described thereafter to highlight my numerous missions. As a preface, all the cumulative criteria used by the tax administration and the Ministry of Higher Education and Research to distinguish between activities eligible for the CIR and activities not eligible for the CIR will be recalled as well as the various tasks performed by the scientific consultant. I dedicated time to analyze the technical paperwork outlining the operations performed by the company "Y" as part of the construction of the supporting technical file. Additionally, I conducted a bibliographic survey to establish the state of the art of the existing knowledge at the outset of the task. My work has made it possible to highlight the limitations of current techniques and methods regarding the resolution of the technical challenges specific to this R&D activity. Finally, as part of my financial valuation activities, I analyzed the eligibility of numerous subcontracting invoices published by research organizations approved under the Research Tax Credit.

## GRUPE SOLABIA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Oriane LE ROUX

Création d'outils d'aide à la vente pour la gamme végétale et marine

Rapport confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Marketing, veille concurrentielle, vulgarisation scientifique, veille de marché, valorisation d'une gamme, formation des équipes, gestion de projet, récolter et synthétiser des informations, analyser et répondre aux besoins du marché

Le Groupe Solabia développe, produit et distribue des ingrédients destinés aux secteurs de la cosmétique, de la pharmaceutique, de l'agro-alimentaire et de la nutrition. J'ai effectué mon stage de fin d'études dans la division cosmétique du groupe qui propose une large gamme d'actifs objectifs et d'extraits inspirationnels destinés aux marques de produits finis.

En tant qu'assistante chef de produit pour la gamme végétale et marine, ma principale mission de stage était de concevoir des outils marketing d'aide à la vente destinés aux commerciaux et aux distributeurs du groupe. Ces outils ont pour objectif de valoriser le portefeuille d'ingrédients de la gamme et de répondre aux exigences des clients et du marché. J'ai tout d'abord effectué une veille concurrentielle dans le but de comparer la gamme végétale et marine du Groupe Solabia par rapport aux concurrents (technologies d'extraction, positionnements de leurs produits, revendications, storytelling). Puis, j'ai créé différents supports marketing tels que des présentations orales et écrites en lien avec une thématique tendance précédemment sélectionnée grâce à un travail de veille marketing (analyse des tendances du marché cosmétique). Les objectifs de ces supports sont de valoriser le portefeuille d'ingrédients en les intégrant dans une tendance du marché et en y ajoutant des données in vitro et in vivo ou des informations bibliographiques.

En parallèle, j'ai réalisé une veille concurrentielle et technologique sur le microbiome cutané de manière à préparer le lancement d'un nouveau produit pour la gamme des ingrédients issus des biotechnologies.

PANTIN • FRANCE

4/3/2023 → 9/1/2023

Creation of sales support tools for the plant and marine range

Marketing, benchmark, scientific popularization, market watch, range promotion, team training, project management, collect and synthesize information, analyze and answer market needs

The Solabia Group develops, manufactures, and supplies ingredients for the cosmetics, pharmaceutical, food and nutrition sectors. I completed my internship in the group's cosmetics division, which offers a wide range of tested active ingredients and inspirational cosmetic extracts for finished product brands.

As a product manager assistant for the plant and marine range, my main mission was to create marketing tools to support the group's sales team and distributors in selling cosmetic ingredients. The aim was to promote the ingredient portfolio and meet customer and market requirements. First, I carried out a competitive study to strategically compare the Solabia group's plant and marine range with its competitors (extraction technologies, positioning, claims, storytelling). Then, I designed various marketing tools, including both verbal and written presentations aligned with a trendy topic selected through a market watch (analysis of cosmetic market trends). The goal is to add value to the range's portfolio of ingredients by integrating them into a market trend and adding in vitro / in vivo data or bibliographical data.

At the same time, I conducted a competitive and technological watch on the skin microbiome to prepare the launch of a new product for the biotechnology-derived ingredients range.

Juliette  
PEYCRU

Classique

## GENETHON

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Valentine BUFFA

Développement d'un test de potency in vitro pour un produit de thérapie génique : rAAV9-FKRP

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Thérapie génique, culture cellulaire, développement analytique, test de potency, dystrophie des ceintures, FKRP, AAV

J'ai réalisé mon contrat de professionnalisation au Généthon. Ce laboratoire à but non lucratif est un leader dans le domaine de la thérapie génique. Au sein de Généthon, j'ai intégré l'équipe de développement analytique, dédié au développement et à l'optimisation de méthodes analytiques pour la caractérisation des vecteurs virus adénoassociés (AAV). Au cours de ce PFE, j'ai travaillé sur le développement d'un test de potency spécifique au vecteur de thérapie génique développé par Généthon permettant de traiter la myopathie des ceintures liée au déficit en gène FKRP (LGMDR9). Cette maladie cause une fatigabilité musculaire à une perte totale de mobilité pouvant aller jusqu'à des atteintes cardiaques et respiratoires. Cette pathologie est due à une mutation du gène FKRP rendant l'enzyme FKRP non fonctionnelle. Celle-ci participe normalement à la glycosylation de la protéine  $\alpha$ -dystroglycane ( $\alpha$ -DG). Lorsque FKRP est mutée, l' $\alpha$ -DG n'est plus glycosylée et ne fait plus le lien entre la matrice extracellulaire et la fibre musculaire.

Ce test de potency est mené en parallèle des essais cliniques lancés par Atamyo sur cette maladie. Il doit mettre en évidence la capacité spécifique du produit à donner un résultat attendu, c'est-à-dire l'expression du gène médicament ainsi que la restauration de l'activité biologique visée. Ici, l'objectif est de détecter FKRP de manière dose-dépendante et de vérifier la restauration de l'activité enzymatique de FKRP sur l' $\alpha$ -DG glycosylée en présence du gène médicament. Durant mon alternance, j'ai étudié la restauration de l'activité de l' $\alpha$ -DG glycosylée en présence du vecteur médicament. Pour cela, une nouvelle lignée cellulaire a été créée et caractérisée. Une fois le modèle cellulaire mis en place, la restauration de l'expression de FKRP et de l' $\alpha$ -DG glycosylée à différentes doses d'AAV médicament a été étudiée. Une nouvelle technique d'analyse a été mise au point et optimisée pour visualiser cette restauration.

## EVRY-COURCOURONNES • FRANCE

10/3/2022 → 10/31/2023

Development of an in vitro potency test for the gene therapy product rAAV9-FKRP

Gene therapy, cell culture, analytical development, potency test, limb girdle dystrophy, FKRP, AAV

I carried out my end-of study project at Genethon, a non-profit research center, leader in the field of gene therapy for rare genetic diseases. Here, I joined the analytical development team, which is focused on the development and optimization of analytical methods to characterize the adeno-associated viral vectors (AAV) used in gene therapy. For one year, I worked on the development of an in vitro potency test for a gene therapy product developed by Genethon to treat limb-girdle muscular dystrophy (LGMDR9). This rare genetic disease leads to progressive muscle loss and, in some cases, cardiac and respiratory damages. LGMDR9 is caused by a mutation in the Fukutin-related protein (FKRP) gene that renders FKRP non-functional. This is an enzyme involved in the glycosylation of the  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) protein. If FKRP is mutated, the  $\alpha$ -DG protein cannot be glycosylated, and so the link between the extracellular matrix and the muscular fiber, essential for the fiber survival, is lost.

This potency assay is carried out in parallel with the clinical trial launched by Atamyo. A potency test must demonstrate the specific ability of a product to attain the expected result, i.e., expression of the therapeutic gene in addition to the restoration of the biological activity. In our assay, the aim is to detect and quantify FKRP expression in a dose-dependent manner and to verify the restoration of its activity on  $\alpha$ -DG glycosylation in the presence of the therapeutic vector. To reach this goal, we generated and characterized a new cell line. Once the cell model was optimized, we studied the restoration of FKRP and glycosylated  $\alpha$ -DG expression when AAV vectors at different doses were administered. We developed and optimized a new analytical method and to visualize this restoration.

Louisa  
 PILI

CP

## EXOTHERA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Tiago ALBANO

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Vecteurs viraux – Purification – Ion Exchange Chromatography – Développement de procédés – Plans d'expérience

Durant la dernière décennie, les premiers traitements basés sur la thérapie génique ont été approuvés et mis sur le marché. Afin de transporter le matériel génétique jusqu'aux cellules, le moyen le plus utilisé actuellement repose sur l'utilisation de vecteurs viraux. Parmi les différents vecteurs possibles, les plus répandus en thérapie génique sont les AAV. La fabrication des AAV est rendue compliquée par la présence de nombreuses impuretés lors de leur production. Améliorer les rendements et la pureté du produit fini va devenir de plus en plus critique afin de satisfaire les besoins de ce marché en pleine croissance. Exothera, une CDMO Belge, a justement pour but de répondre à ces préoccupations et de réduire le coût de production des thérapies géniques pour les rendre accessible à une plus grande part de la population. Dans le cadre de mon projet de fin d'études, j'ai rejoint l'équipe R&D d'Exothera pour un stage de 6 mois, afin de travailler en tant que Junior Scientist sur le projet ExoReady, dont l'objectif est de créer une plateforme pour la production de vecteurs viraux, et en particulier des AAV. L'un des principaux problèmes rencontré durant la production des AAV est la grande proportion de capsides ne contenant pas d'ADN. Ces particules vides sont des impuretés qui doivent être éliminés du produit fini, mais les séparer des vecteurs entiers se révèle compliqué. En effet, leurs propriétés sont quasiment identiques et la méthode usuelle d'ultracentrifugation basée sur la différence de densité existant entre les deux est compliquée à mettre en œuvre à échelle industrielle en plus d'utiliser des produits toxiques. Néanmoins, une faible différence de charge de surface permet de les séparer par chromatographie d'échange d'ions. Cette technique reste peu efficace et est un sujet d'intenses recherches. Dans ce contexte, le sujet principal de mon stage était d'améliorer l'étape de polishing des AAV8 pour la séparation des capsides vides et des vecteurs viraux.

6040 JUMET • BELGIQUE

4/3/2023 → 10/4/2023

Separation of full and empty viral particles of adeno-associated virus during downstream processing

Vecteurs viraux – Purification – Ion Exchange Chromatography – Développement de procédés – Plans d'expérience

During the last decade, gene therapies have become a reality and the first treatments based on this technology were approved. Viral vectors (viruses engineered to carry a gene of interest through the body toward the cell nucleus) are the most popular technique used to deliver genetic material to patients for gene therapy. Recombinant AAV (Adeno-Associated Virus) are currently the most used viral vectors, but their manufacturing is challenging because of high content of process related impurities. Increasing yields and purity of final product will be of critical interest to meet the needs of this growing market. The company Exothera, a Belgian CDMO, aims to answer these issues in viral vector production, thus reducing the cost of gene therapy to make them available for a larger proportion of the population. For my End-of-Study project, I joined the R&D team of Exothera for 6 months to work as Junior Scientist on the project ExoReady, whose main goal is to create a versatile platform for viral vector manufacturing, notably AAV. The main issue faced in AAV production is the high amount of empty particles, which do not bear DNA. These empty capsids are impurities and their removal is required prior injection to patient, but separating them from the full viral vectors is made very difficult. Both are almost identical, and traditional ultracentrifugation methods based on density differences can hardly be scaled up in addition to using toxic compounds. Due to slightly different surface charge, empty and full capsids have found to be separated by IEX chromatography. This remains complicated due to the similarity between these two subpopulations. As such, polishing by ion exchange chromatography is the most challenging step for viral vector purification and still a matter of intense research. In this context, the purpose of my internship was to improve purification of AAV, with a strong focus on polishing for separation of empty particles from genome containing vectors.

Hugo  
PITAVAL

CBI

**SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Théo PIZETTE

**Etude des mutations de charge pour atténuer le mésappariement des chaînes légères des anticorps bispécifiques**

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Anticorps bispécifiques, mésappariement, purification, production, haut-débit, mutations de charge, KIH, CEX

Partie intégrante du Centre de recherche de Vitry/Alfortville de Sanofi, la plateforme AMP est une plateforme de haut débit spécialisée dans la production, purification et caractérisation d'anticorps monoclonaux (mAbs). Elle permet ainsi de soutenir les activités de recherche de plusieurs aires thérapeutiques telles que l'immuno-oncologie ou encore l'immuno-inflammation. Avec l'émergence des anticorps bispécifiques à des fins thérapeutiques et de diagnostic, Sanofi a commencé à se tourner vers ces formats. Face à la complexité de génération d'anticorps bispécifiques conformes, le besoin d'améliorer l'affinité d'association de ces chaînes s'est présenté. Plusieurs techniques et formats ont été élaborés afin de produire des anticorps hétérodimériques avec une architecture similaire à celle d'un mAb. Si l'utilisation du knob-into-hole (KIH) permet de stabiliser l'appariement des chaînes lourdes entre elles, plusieurs approches sont utilisées pour résoudre le mésappariement des chaînes légères. De ce fait, Sanofi s'est dirigée vers l'utilisation de mutations de charge afin d'atténuer le mésappariement des chaînes légères des anticorps bispécifiques. Pour ce faire, différentes combinaisons de mutations de charge ont été évaluées au cours de mon contrat de professionnalisation.

L'ensemble des expériences de production, purification et caractérisation d'anticorps bispécifiques a permis de déterminer une combinaison de mutations optimale. Cette combinaison a été sélectionnée après un panel de plusieurs analyses comprenant une chromatographie analytique d'interaction hydrophobe (HIC), la spectrométrie de masse, l'électrophorèse microfluidique et l'analyse du taux de production. La mise en place d'une chromatographie analytique échangeuse de cations (CEX) a aussi été un élément clé dans la détermination du mésappariement. Pour finir, l'étude a su démontrer l'intérêt et l'efficacité de l'ajout de mutations de charge afin de produire des anticorps hétérodimériques conformes.

VITRY SUR SEINE • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

**Study of charge mutations to reduce light chain mispairing of bispecific antibodies**

Bispecific antibodies, mispairing, purification, production, high-throughput, charge mutations, KIH, CEX

As part of Sanofi's Vitry/Alfortville Research Center, the AMP platform is a high-throughput platform for monoclonal antibody production, purification, and characterization. AMP supports a lot of therapeutic areas including immuno-oncology and immuno-inflammation. With the emergence of bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic purposes, Sanofi has begun to turn to these formats. Given the complexity of generating compliant bispecific antibodies, the need arose to improve the association affinity of these chains. Several techniques and formats have been developed to produce heterodimeric antibodies with an IgG-like architecture. While the use of knob-into-hole (KIH) stabilizes the pairing of heavy chains, several approaches are used to resolve the mispairing of light chains. As a result, Sanofi has turned to the use of charge mutations to reduce light chain mispairing of bispecific antibodies. To achieve this, we studied the use of charge mutations to reduce light chain mispairing of bispecific antibodies during my work study contract. All the bispecific antibody production, purification, and characterization experiments were used to determine an optimal combination of mutations. This combination was obtained after a range of analyses including analytical hydrophobic interaction chromatography (HIC), mass spectrometry, microfluidic electrophoresis, and expression level analysis. The use of analytical cation exchange chromatography (CEX) was also a key element in determining the mispairing. Finally, the study demonstrates the interest and effectiveness of adding charge mutations to produce heterodimeric antibodies.

Candice  
 RAYNAUD

CP

DIONYMER

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Antoine BREGE

Optimisation des milieux de fermentation pour la production de polyhydroxyalcanoate (PHA)

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Polyhydroxyalcanoate, biopolymères, fermentation, optimisation, économie circulaire

Le plastique est l'un des matériaux omniprésents dans notre quotidien. Or, ce plastique très majoritairement d'origine pétrochimique n'est malheureusement pas ou peu recyclé, et termine souvent sa course dans des décharges sauvages. Il est donc essentiel que des matières plus respectueuses de l'environnement prennent une part beaucoup plus importante du marché.

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polyesters aliphatiques biosourcés et biodégradables, naturellement synthétisés par de nombreux microorganismes. Ces polymères présentent des propriétés d'un grand intérêt pour de nombreux industriels, mais leur utilisation est actuellement limitée en raison de leur coût élevé.

Dionymer, une jeune start-up de biotechnologie bordelaise, mise sur l'utilisation de déchets alimentaires comme substrat afin de produire des PHA de haute qualité et à un prix compétitif.

Ce projet porte sur l'optimisation des procédés de fermentation, notamment sur la composition du milieu de culture. L'objectif est triple : améliorer les rendements de production, diminuer les coûts de production, et s'assurer de l'obtention d'un polymère de haute pureté. Une opération de screening a été menée en erlenmeyers, suivi par quelques essais en batch en bioréacteur. Ainsi, ce projet implique la préparation et le suivi de cultures microbiennes, mais également l'extraction du polymère accumulé intracellulairement et son analyse.

BORDEAUX • FRANCE

2/6/2023 → 8/4/2023

Optimisation of fermentation media for polyhydroxyalkanoate (PHA) production

Polyhydroxyalkanoate, biopolymers, fermentation, optimisation, circular economy

Plastic is one of the most common materials in our daily lives. However, most of this plastic is of oil-based, and is rarely recycled if at all, often ending up in unauthorised landfill sites. It is therefore essential that more eco-friendly materials take a larger share of the market.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biobased and biodegradable aliphatic polyesters, naturally synthesised by numerous micro-organisms. These polymers have properties that are of great interest to many industries, but their use is currently limited by their high cost.

Dionymer, a young biotechnology start-up based in Bordeaux, is focusing on the use of food waste as substrate in order to produce high-quality PHAs at a competitive price.

This project focuses on fermentation process optimisation, with particular emphasis on the composition of the culture medium. The aim is threefold: to improve production yields, reduce production costs and ensure a high-purity polymer is obtained. A screening operation was carried out in shake flasks, followed by a several batch attempts in a bioreactor. This project involves the preparation and monitoring of microbial cultures, as well as the extraction and analysis of the intracellularly accumulated polymer.

Meghan  
ROBINSON

Mobilité

PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Nicolas STEWARD

Mise en place d'un procédé haute densité pour la production d'une molécule d'intérêt dermo-cosmétique chez une microalgue //

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Microalgues, fermentation, culture haute densité, optimisation, dermocosmétique

Les microalgues sont des organismes présentant de nombreuses applications industrielles : de la production de compléments alimentaires, à la production de biocarburant en passant par le développement de molécules d'intérêt pharmaceutique et cosmétique, elles séduisent par leur facilité de culture et leur faible impact environnemental. Les principales espèces qui sont cultivées aujourd'hui en industrie sont les microalgues des genres *Chlorella* sp. et *Spirulina* sp. L'intérêt porté à ces microorganismes provient de la diversité des molécules qu'ils produisent (lipides, glucides, protéines et pigments) et de l'adaptabilité des procédés de production. En effet, ces microalgues ont la capacité de croître en condition autotrophes au carbone, à la lumière et en présence de CO<sub>2</sub>, et/ou en conditions hétérotrophe au carbone, à l'obscurité et en présence d'un substrat carboné comme le glucose. L'avantage de la culture en conditions hétérotrophes est la possibilité de faire des cultures avec une densité élevée qu'en conditions autotrophe. En effet, en culture autotrophe, la concentration cellulaire limite le passage de la lumière dans la culture et donc la croissance. Au laboratoire de biotechnologies végétales pour la recherche appliquée dermo-cosmétique des Laboratoires Pierre Fabre, un actif issu de la culture de microalgues a été développé. Au cours de mon contrat de professionnalisation, j'ai eu pour mission d'optimiser la culture en bioréacteur de la microalgue pour atteindre des cultures en haute densité cellulaire ainsi que d'optimiser les conditions de culture pour la surproduction du composé d'intérêt.

BOULOGNE • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

Implementation of a high-density process for the production of a molecule of dermocosmetic interest in microalgae

Microalgae are organisms with many industrial applications: from food supplements and biofuel production to the development of pharmaceuticals and cosmetics molecules, they are attractive for their ease of cultivation and their low environmental impact. Microalgae from the genus *Chlorella* sp. and *Spirulina* sp. are the most cultivated for industrial purposes today. The diversity of produced molecules by microalgae (lipids, proteins, carbohydrates, and pigments) and adaptability of their production processes explain the interest of industrials for those microorganisms. They can grow under autotrophic conditions for carbon, with light and CO<sub>2</sub> supply, and/or under heterotrophic conditions for carbon, in the dark and with carbonate source such as glucose. At the vegetal biotechnologies laboratory for dermo-cosmetic applied research of Pierre Fabre Laboratories, an active ingredient derived from the cultivation of microalgae have been developed. During my apprenticeship, I worked on the optimization of the microalgae culture in bioreactor, to reach high cell density culture, and on the optimization of culture condition for the overproduction of the compound of interest.

Clara  
SALAUN

CP

**SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Stéphane FOURNEAUX

Optimisation et comparaison de données obtenues à partir d'une méthode de quantification des agrégats protéiques

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Anticorps monoclonaux, agrégation, particules subvisibles, Micro-Flow Imaging (MFI), Background Membrane Imaging (BMI), Plans d'expérience (DoE), Horizon

Les formulations de médicaments injectables font l'objet d'une réglementation concernant la teneur en particules subvisibles. Les pharmacopées USP <787> et USP <788> décrivent les méthodes analytiques retenues. Les formulations des biothérapeutiques (anticorps monoclonaux) développées sont testées et analysées avec un niveau de particules à teneur limitée. C'est dans ce contexte que j'ai effectué mon stage. Actuellement, le personnel du laboratoire utilise une méthode de quantification avec le Micro-Flow Imaging (MFI). Cette technique présente comme principal inconvénient d'être chronophage. C'est pourquoi, une méthode alternative, sur l'appareil Horizon, est en cours d'implémentation au laboratoire et pourrait augmenter le débit d'analyse. Le principe de cette méthode repose sur le dépôt d'échantillon sur une membrane poreuse puis acquisition d'images avant et après dépôt. La méthodologie générale utilisée sur l'appareil Horizon nécessite d'être développée car les résultats actuels sont sujets à discussions tant dans les conditions de manipulations que dans les résultats obtenus. Les objectifs de mon stage étaient donc, dans un premier temps, de développer une méthode permettant d'obtenir des résultats fiables avec l'appareil Horizon, puis dans un second temps, de comparer les résultats obtenus entre méthode Horizon et MFI. La mise en place d'un dialogue avec le fournisseur HaloLabs via un support dédié a permis de lever des points de blocages opérationnels et logiciels afin de contribuer à l'aboutissement d'une méthode développée. Une fois le fonctionnement de l'appareil mieux compris, l'optimisation de la méthode s'est faite par stratégie DoE. Le modèle généré nous a permis de trouver des conditions optimales pour la réduction du %CV. Une méthode pour l'appareil Horizon a donc été développée et convient pour une utilisation future au laboratoire tout en prenant en compte qu'il existe certaines limites qui ont aussi été étudiée avant la fin du stage. Des résultats préliminaires entre la méthode MFI et Horizon montrent qu'ils sont dans des niveaux de précision équivalents.

Gregory  
TASTET

Classique

**VITRY SUR SEINE • FRANCE**

3/6/2023 → 9/1/2023

Optimization and comparison of data obtained from a method for quantification of protein aggregates

Monoclonal antibodies, aggregation, subvisible particles, Micro-Flow Imaging (MFI), Background Membrane Imaging (BMI), Design of Experiment (DoE), Horizon

The formulations of injectable drugs are subject to regulations regarding the content of subvisible particles. The USP <787> and USP <788> pharmacopeias describe the adopted analytical methods. Formulations of developed biotherapeutics (monoclonal antibodies) are tested and analyzed with a limited particle content. It's within this context that I conducted my capstone project. Currently, the laboratory personnel employs a quantification method using Micro-Flow Imaging (MFI). This technique's main drawback is its time-consuming nature. This is why an alternative method, using the Horizon instrument, is being implemented in the laboratory to potentially enhance the analysis throughput. The principle of this method is based on the sample deposition onto a porous membrane, followed by image acquisition before and after deposition. The general methodology employed on the Horizon instrument needs to be developed further as current results are subject to discussions both regarding manipulation conditions and obtained outcomes. The goals of my project were, firstly, to develop a method to obtain reliable results with the Horizon instrument, and secondly, to compare the results obtained using the Horizon method with those with MFI. Establishing a dialogue with the supplier HaloLabs through a dedicated support channel helped resolve operational and software-related roadblocks, contributing to the development of a successful method. Once the instrument's functioning was better understood, method optimization was achieved through DoE strategy. The generated model enabled us to identify optimal conditions for reducing %CV. A method for the Horizon instrument was thus developed and is suitable for future use in the laboratory, while taking into consideration certain limitations that were also explored before the conclusion of the project. Preliminary results comparing the MFI and Horizon methods indicate that they are within equivalent precision levels.

QUANTOOM BIOSCIENCES

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

Optimisation d'un procédé de production de self-amplifying RNA

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Développement de procédé – Biologie moléculaire – ARNm – Upstream process (USP) – Transcription in vitro – self-amplifying RNA

Actuellement, l'ARN messenger (ARNm) fait partie des molécules biologiques les plus prisées pour les nouvelles approches thérapeutiques. Quantoom Biosciences se focalise sur la création de machines de production automatisée d'ARNm. Son objectif vise à développer une plateforme de production continue réduisant drastiquement les coûts de production favorisant un accès équitable aux vaccins à ARN pour les pays à revenus faibles et intermédiaires. Pour ce faire, des procédés de production et de purification d'ARNm à moindre coût sont à développer et ce pour tout type d'ARN dont les saRNA (ARN auto-répliatif). Les vaccins saRNA diffèrent des vaccins à ARNm classiques notamment par leur taille se situant entre 9 kb et 12 kb contre 1 kb à 4 kb pour un ARNm non-répliatif. Le saRNA a pour principal atout, par sa conception, son auto-répliation dans la cellule hôte. L'injection d'une faible quantité entraîne la production d'une grande quantité d'ARN, réduisant les besoins de production et donc les coûts.

L'équipe de développement de procédés USP a optimisé un procédé de transcription in vitro pour la production d'ARNm non-répliatif. Cependant, avec une telle différence de taille entre l'ARNm et le saRNA, les spécifications de qualité, et spécialement d'intégrité absolue, ne sont pas atteintes lors de la production de saRNA. Le projet saRNA de l'entreprise vise à optimiser un procédé de production de saRNA avec comme critères de succès un rendement de production supérieur à 4 mg/mL et une intégrité absolue au-dessus de 80%.

Ce stage a pour objectif d'investiguer les causes de la faible qualité du saRNA produit avant de trouver des solutions d'optimisation. Cela passe notamment par la détermination de la qualité de l'ADN linéarisé utilisé. De plus, le saRNA est plus sujet à l'hydrolyse qu'un ARNm non-répliatif. L'investigation des paramètres (température et temps d'incubation, valeur de pH) ainsi que des composants de la réaction de transcription in vitro (concentration en MgCl<sub>2</sub>, tampon) permettrait de réduire l'impact de l'hydrolyse. Des solutions d'optimisation sont trouvées via la création d'un plan d'expérience ainsi que la modification du temps de réaction.

1400 NIVELLES • BELGIQUE

2/20/2023 → 8/25/2023

Messenger RNA (mRNA) is, currently, one of the most valued biological molecules for developing new therapeutic approaches. At Quantoom Biosciences, the company is focusing on creating machines for the automated production of mRNA. The aim is to develop a continuous production platform that will reduce drastically the production costs therefore enabling low- and middle-income countries to have access to RNA vaccines. To achieve this, low-cost mRNA production and purification processes need to be developed and optimized for all types of RNA. Among them, Quantoom is specifically interested in saRNA (self-amplifying RNA). The saRNA vaccines differ from conventional mRNA vaccines in that their size is comprised between 9 kb and 12 kb in size, whereas a conventional mRNA size is comprised between 1 kb and 4 kb. The saRNA's main advantage, by design, is its self-replication in the host cell. The injection of a low quantity produces a large quantity of RNA, thus reducing production requirements and production costs.

The USP process development team optimized an in vitro transcription production process for conventional mRNA. However, with such a size difference between mRNA and saRNA, the quality specifications are not reached while producing saRNA. The saRNA project in this company aims to optimize a saRNA production process to reach over 4 mg/mL in yield as well as 80% absolute integrity.

The aim of this internship is therefore to investigate and understand the causes of the low quality of the saRNA produced, before finding optimization solutions. This involves determining the quality of the linearized DNA used for saRNA production. In addition, saRNA, due to its large size, is more prone to hydrolysis than conventional mRNA. Investigation of the production parameters (incubation temperature, pH value, incubation time) as well as some of the components of the in vitro transcription reaction (MgCl<sub>2</sub> concentration, type of buffer used) could help reduce the impact of RNA hydrolysis. Optimization solutions were found, in particular by creating an experimental design and modifying the reaction time.

Simon THIOU

Mobilité

## L'OREAL RECHERCHE AVANCEE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Maude BROSSAT

Valorisation de la biodiversité microbienne et rationalisation de son usage pour l'exploration de nouveaux principes actifs à visée cosmétique

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

Microbiologie Microbiome Mycologie Co-culture Analyse non ciblée

Mon projet de fin d'études chez L'Oréal a été réalisé au sein du domaine de découverte spécialisé sur le microbiome. La peau abrite des milliards de bactéries, champignons et virus, et il a été mis en évidence que ce microbiote jouait un rôle non négligeable dans l'apparition de certains désordres cutanés. En dépit des changements environnementaux, les communautés microbiennes de la peau d'un adulte sain restent constantes à travers le temps. Des déséquilibres parmi ces communautés en principe stables et la surreprésentation de certains micro-organismes conduisent à une dysbiose qui peut être la source de certaines pathologies.

Mon rôle en tant qu'alternant a été d'explorer la production de métabolites antibactériens par un champignon en le co-cultivant avec une bactérie. L'objectif est d'exercer un stress biotique sur la souche fongique pour qu'elle exprime des gènes de défense et de survie qui ne sont traditionnellement pas observés en monoculture in vitro. En ciblant ainsi la bactérie à l'origine de la dysbiose, cette méthode permettrait d'obtenir un extrait antibactérien sélectif et efficace pour rétablir un microbiome sain mais aussi d'avoir accès à des molécules biosourcées et d'origine renouvelable valorisables par L'Oréal.

Après une étude bibliographique réalisée sur les différentes manières de faire exprimer ces gènes silencieux chez les microorganismes, plusieurs stratégies d'élicitation ont été mises en œuvre. Les métabolites sont ensuite extraits par l'utilisation de solvants et l'activité antibactérienne des fractions obtenues est évaluée. Enfin, en collaboration avec le département d'analyse, les extraits fongiques les plus performants sont analysés par analyse non ciblée LC-HRMS/MSMS pour identifier les molécules d'intérêt.

AULNAY SOUS BOIS • FRANCE

10/3/2022 → 9/29/2023

Valorization of microbial biodiversity and rationalization of its use for the exploration of new active ingredients for cosmetic purposes

Microbiology Microbiome Mycology Co-culture Untargeted analysis

My end-of-studies project at L'Oréal was carried out within the microbiome discovery domain. The skin is home to billions of bacteria, fungi and viruses, and it has been shown that this skin microbiota plays a significant role in the appearance of certain cutaneous disorders. Despite environmental changes, the microbial communities of healthy adult skin remain constant over time. Imbalances among these communities and the overrepresentation of certain microorganisms lead to what is called dysbiosis, which can be the source of certain pathologies.

My role as an apprentice was to explore the production of antibacterial metabolites by a fungus by co-cultivating it with bacteria. The objective is to exert a biotic stress on the fungal strain so that it expresses defense and survival genes that are not traditionally observed in in vitro monoculture. By targeting the bacteria at the source of dysbiosis, this method would make it possible to obtain a selective and effective antibacterial extract that restores a healthy microbiome, but also to have access to bio sourced molecules of renewable origin that can be used by L'Oréal.

After a bibliographic study carried out on the different ways to express these silent genes in microorganisms, several coculture strategies were tested. The metabolites were then extracted using solvents and their antimicrobial activity was assessed. In collaboration with the analysis department, the most potent fungal extracts were analyzed by non-targeted LC-HRMS/MSMS analysis to identify the molecules of interest.

Leo  
UDOVTSCH

CP

TREEFROG

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

Mise en place d'un suivi de croissance de micro-tissus cultivés en bioréacteur par mesure en ligne de la capacitance des cellules

Rapport confidentiel  
 Soutenance confidentielle

Capacitance, culture cellulaire, micro-tissus, croissance, viabilité, monitoring

Treefrog Therapeutics est une entreprise qui développe des thérapies cellulaires dans les domaines de la neurodégénérescence, des troubles cardio-métaboliques et d'immuno-oncologie. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) encapsulées par sa technologie C-Stem sont cultivées en bioréacteur dans un processus maîtrisé, mais des difficultés subsistent pour compter les cellules en cours de culture et caractériser les micro-tissus (MTs) obtenus. Le suivi de la croissance cellulaire demande d'employer des méthodes de comptage directes ou indirectes. Cependant, ces méthodes nécessitent un prélèvement du bioréacteur et dans le cas de formation de MTs une dissociation des cellules, le tout impliquant un travail laborieux de manipulation, une perte de cellules et un risque de contamination du bioréacteur. La mesure in-situ de la capacitance des cellules comme méthode de suivi de la croissance cellulaire est une piste intéressante qui répond à ces difficultés.

Détectant les cellules par leurs propriétés diélectriques, la capacitance peut être utilisée comme moniteur continu en ligne de la croissance d'une culture. Elle dispose d'avantages non négligeables mais les données obtenues sur des agrégats de cellules en différenciation se montrent difficiles à analyser. Ce projet a démontré que la capacitance est un outil permettant de comparer la croissance de différentes cultures de micro-tissus par suivi de la permittivité relative. En outre, l'évolution de ce signal suit les différentes phases de la culture. Enfin, elle permet aussi de mettre en évidence des complications d'une culture comme l'apparition de mort cellulaire par diminution de la permittivité relative.

Cet outil a le potentiel d'être un outil d'analyse approfondie, mais la complexité et la variabilité des objets étudiés demande d'obtenir un grand nombre de réplicats afin que son signal devienne réellement utilisable en procédé.

Paul  
 VAAST

CP

PESSAC • FRANCE

10/3/2022 → 11/28/2023

Implementation of a growth monitoring system for micro-tissues cultivated in a bioreactor through online measurement of cell capacitance

Capacitance, cell culture, micro-tissues, growth, viability, monitoring

Treefrog Therapeutics is a company that develops cellular therapies in the fields of neurodegeneration, cardio-metabolic disorders, and immuno-oncology. iPSCs encapsulated using their C-Stem technology are cultured in bioreactors within a controlled process. However, challenges persist in counting cells during culture and characterizing the resulting micro-tissues (MTs). Monitoring cell growth requires the use of direct or indirect counting methods. Nevertheless, these methods necessitate sampling from the bioreactor and, in the case of MT formation, cell dissociation, all of which entail labor-intensive manipulation, cell loss, and a risk of bioreactor contamination. In-situ measurement of cell capacitance as a method for tracking cell growth presents a pertinent approach that addresses these issues.

By detecting cells based on their dielectric properties, capacitance can serve as a continuous online monitor of culture growth. It offers significant advantages, although data obtained from differentiated cell aggregates proves difficult to analyze. This project has demonstrated that capacitance is a tool enabling comparison of the growth of various micro-tissue cultures through monitoring relative permittivity. Furthermore, changes in this signal correspond to the different phases of the culture. Lastly, it also helps identifying culture complications such as the occurrence of cell death indicated by a decrease in relative permittivity.

This tool holds the potential to be an in-depth analysis instrument, yet the complexity and variability of the studied objects necessitate obtaining a large number of replicates for its signal to become truly usable in the process.

COVALAB

BRON • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Lamia MEBARKI

3/1/2023 → 8/31/2023

Vers le développement d'un réacteur enzymatique

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

R&D – ADC – enzymologie – biochimie – ingénierie des anticorps – transglutaminase microbienne (mTG)

Mila  
VILLATTE

Mobilité

Le but de mon stage était de développer un réacteur enzymatique pour faciliter la production d'ADC (Antibody-Drug Conjugates). L'enzyme est la transglutaminase microbienne (mTG) qui est capable de coupler la chaîne latérale de la glutamine (Q) à une amine primaire. Ceci nous permet de coupler un agent cytotoxique à un anticorps portant un « Qtag » pour former un ADC. Ce Qtag est incorporé par ingénierie génétique à l'anticorps et permet le greffage d'un médicament de façon site spécifique. Mon projet était basé sur le développement, la caractérisation et l'optimisation des conjugaisons et il s'est fragmenté en deux parties. L'une correspond au développement d'un réacteur en phase solide où la mTG était conjugée à un support solide et l'autre correspond au développement d'un réacteur en phase aqueuse.

J'ai participé à la production et la purification de la mTG dans un système procaryote (E. coli) et j'ai optimisé les conditions d'activation de celle-ci. Pour le réacteur en phase solide, j'ai immobilisé la mTG sur support solide et j'ai testé son activité. Pour cela, j'ai couplé un substrat fluorescent sur un anticorps par l'action de la mTG fixée. Pour le réacteur en phase solide, j'ai criblé plusieurs conditions de greffage pour la conjugaison de l'Ac à des molécules fluorescentes ou à un agent cytotoxique. J'ai finalement caractérisé de façon biochimique ces anticorps conjugués par évaluation du DAR (Drug-Antibody Ratio) sur HPLC et j'ai analysé l'interaction de l'ADC néosynthétisé aux récepteurs cellulaires cibles sur cytomètre en flux (FACS).

Les techniques que j'ai pu utiliser sont nombreuses. Pour la production de la mTG, j'ai pu participer à l'élaboration des constructions, à la transformation bactérienne, au clonage In-fusion, à la production en Erlenmeyer puis à la purification en chromatographie d'affinité ou d'exclusion stérique sur AKTA-Pure. Pour le développement de mes réacteurs, j'ai criblé des conditions de conjugaison enzymatique que j'ai analysées et caractérisées sur HPLC, SDS-PAGE et Western-Blot. J'ai maintenu des lignées cellulaires afin d'analyser l'interaction de mes ADC sur cytomètre en flux (FACS).

The aim of my internship was to develop an enzymatic reactor to facilitate the production of ADCs (Antibody-Drug Conjugates). The enzyme used is the microbial transglutaminase (mTG), which is capable of coupling the side chain of glutamine (Q) to a primary amine. This enables the coupling of a cytotoxic agent to antibody carrying a "Qtag" to form ADC. This Qtag has been engineered into an antibody, enabling site-specific drug conjugation. My project was based on the development, the characterization and the optimization of conjugations conditions, and was separated into two parts. The first part was the development of a solid-phase reactor in which mTG was conjugated to a solid support, and the second part was the development of an aqueous-phase reactor.

I took part in the production and the purification of mTG in a prokaryotic system (E. coli) and optimized its activation conditions. For the solid-phase reactor, I immobilized mTG on a solid support and tested its activity. For this, I coupled a fluorescent substrate to an antibody through the action of the immobilized mTG. For the solid-phase reactor, I screened several grafting conditions for the conjugation of the Ac to fluorescent molecules or to a cytotoxic agent. Finally, I biochemically characterized these antibody conjugates by evaluating the DAR (Drug-Antibody Ratio) on HPLC, and analyzed the interaction of the neosynthesized ADC with target cell receptors on flow cytometry (FACS).

To achieve this, I used several techniques. For mTG production, I was involved in construct development, bacterial transformation, in-fusion cloning, erlenmeyer production and purification by affinity or steric exclusion chromatography using AKTA-Pure device. For the development of my reactors, I screened enzymatic conjugation conditions that were analyzed and characterized on HPLC, SDS-PAGE and Western-Blot. I maintained cell lines to analyze the interaction of my ADCs on flow cytometer (FACS).

CHAIRE DE BIOTECHNOLOGIE DE CENTRALESUPELEC - LABORATOIRE DE GENIE DES PROCÉDES ET MATERIAUX

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Mme Madeleine CHARBONNIER

Optimisation des conditions de croissance et de stress de cultures de microalgues psychrophiles, afin de produire des molécules à haute valeur ajoutée (caroténoïdes)

Rapport non confidentiel  
Soutenance non confidentielle

Microalgues, suivi de culture, optimisation, R&D, photobioréacteur, caroténoïdes, chromatographie ionique, HPLC-UV

La Chaire de Biotechnologie de CentraleSupélec est située dans les laboratoires du Centre Européen de Biotechnologie et de Bioéconomie à Pomacle (51). C'est un espace dédié à la recherche, sur de nombreuses thématiques telles que des cultures microbiennes, ou encore des biomatériaux. L'intérêt pour les microalgues est grandissant, car elles sont notamment sources de molécules à haute valeur ajoutée. C'est pourquoi j'ai cultivé des microalgues pour la production de caroténoïdes secondaires, en particulier de l'astaxanthine. Il s'agit d'un des plus puissants antioxydants, commercialisé pour le marché de la santé uniquement lorsqu'il est produit par voie de biosynthèse. Or ces procédés sont encore très coûteux. L'objectif de mon stage portait donc sur l'optimisation de cette production par deux différentes souches psychrophiles (dont la température optimale est proche de 12°C) à l'échelle laboratoire. Il s'agit de microalgues responsables du phénomène des neiges rouges. En effet, cultiver ces souches permettrait de réduire les coûts liés au chauffage et de tester des souches jamais exploitées à l'échelle industrielle.

Pour obtenir ces pigments d'intérêt, des cultures ont été réalisées en photobioréacteurs de 6 L et en erlenmeyers de 100 mL à 1 L sous des conditions optimales de croissance. Cette phase est appelée la phase verte, due à la production de chlorophylles par les cellules. Une fois la phase de plateau de la croissance atteinte, plusieurs paramètres stressant les microalgues ont été étudiés. Cette étape est appelée la phase rouge, due à la production de pigments caroténoïdes rouge-orange. Ces derniers vont se lier aux radicaux libres responsables du stress oxydatif et ainsi protéger les cellules. Le stress est induit en transférant les cellules dans des milieux carencés en azote, avec l'application d'une plus forte intensité lumineuse et d'une plus forte salinité. Les pigments obtenus sont quantifiés à l'HPLC, et ainsi des conditions de culture préférentielles ont été établies pour la production de ces caroténoïdes.

POMACLE • FRANCE

4/3/2023 → 9/27/2023

Optimization of the growth and stress conditions for psychrophilic microalgae cultures, to produce high-added-value molecules (carotenoids)

Microalgae, cultures, optimization, R&D, photobioreactor, carotenoids, ionic chromatography, H

The Chair of Biotechnology of CentraleSupélec is located in the laboratories of the "Centre Européen de Biotechnologie et de Bioéconomie" in Pomacle (51). This is a research place, for numerous subjects like microorganisms' cultures or biomaterials. The interest in microalgae is currently growing because they are a source of high-added-value molecules. This is the reason why I cultured microalgae for secondary carotenoids production, essentially astaxanthin. It is a powerful antioxidant, commercialized for the health market only if it is produced by a biosynthetic pathway. However, these processes are still pricey, so the goal of my internship was to optimize the production by two different psychrophilic strains (with an optimal temperature of around 12°C) at laboratory scale. These microalgae are responsible for the red snow phenomenon. Indeed, culturing these strains for carotenoids production could reduce the heating cost, and permit testing strains that have never been exploited at an industrial scale.

To obtain these pigments of interest, cultures have been carried out in 6L-photobioreactors and erlenmeyers from 100 mL to 1 L under optimal growth conditions. This stage is called the green stage, because of the chlorophyll production by the cells. Once the growth achieves the stagnation stage, several parameters responsible for stress were studied. This step is called the red phase, due to the orange/red secondary carotenoids production. These pigments will create bonds with free radicals responsible for oxidative stress and so protect the cells. The stress is induced by transferring cells in nitrogen-free media, with high salinity and application of high light intensity. The obtained pigments are quantified by HPLC and the best cultures conditions have been established for production of these carotenoids.

Julie  
VOINCON

CBI

YPOSKESI

CORBEIL-ESSONNES • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Adrien AUFFRET-CARIOU

10/3/2022 → 9/29/2023

Optimisation de la production de vecteurs viraux rAAVs

rAAVs - Optimisation des procédés – USP - Plan d'expérience - Sérotype - Transfection

Yposkesi est une entreprise de production de rAAVs et rLV à l'échelle industrielle. Afin de répondre à la demande du marché et de ses clients, des plateformes de production de lentivirus et de rAAVs ont été mises en place.

Les rAAVs sont des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique notamment en stratégie in vivo comme vecteur pour amener un transgène dans les cellules du patient. Ils ont l'avantage d'être non pathogène et existent sous une déclinaison de 12 sérotypes qui leur permettent d'acquérir une spécificité tissulaire. Ces dernières années, de nombreux traitements se développent employant des sérotypes jusque-là encore peu utilisés. Les équipes d'Yposkesi travaillent ainsi sur la mise en place de nouvelles plateformes de production de rAAV pour ces nouveaux sérotypes afin de se préparer à une future demande client. Chaque sérotype va avoir des spécificités propres qui peuvent challenger le procédé. Il est donc important d'adapter le procédé au sérotype ainsi qu'aux besoins du client.

Dans ce cadre, les différentes étapes du procédé allant de la culture en bioréacteur à la purification finale seront évaluées et optimisées afin d'exploiter le plein potentiel de la plateforme. Lors de ce stage, deux premières études sous la forme de plans d'expérience ont été réalisées sur les étapes de transfection et de clarification du procédé rAAV sérotype X. L'optimisation de l'étape de transfection a permis de définir le ratio inter plasmides, le ratio ADN / cellules, le ratio agent de transfection / ADN ainsi que la concentration cellulaire à la transfection optimaux afin d'obtenir une meilleure productivité. L'étude sur la clarification a quant à elle été réalisée afin de minimiser les pertes liées à cette étape, pertes mises en évidence dans des études annexes. Pour ce faire, différents mélanges lors de la lyse ont été testés. Afin de définir ces conditions optimales, des analyses statistiques ont été réalisées afin d'évaluer l'importance de chaque facteur étudié.

Yposkesi is an industrial-scale production structure for rAAVs and rLVs. To meet market and customer demand, production platforms has been set up, notably for lentiviruses and for rAAVs.

rAAVs are viral vectors used in vivo gene therapy to deliver a transgene to the patient's cells. They have the advantage of being non-pathogenic and exist in 12 different serotypes, giving them a tissue specificity. In recent years, new treatments have been developed using serotypes that were previously barely used. Yposkesi's teams are working on the development of new rAAV production platforms to meet potential future customer demand. Each serotype has its own specificities which can challenge the process. Thus, it is important to adapt the process to the serotype.

In this context, the different steps of the process, from bioreactor culture to final purification, will be evaluated and optimized to exploit the full potential of the platform. During this apprenticeship, two studies in the form of design of experiment were carried out on the transfection and clarification steps of the rAAV serotype X process. The transfection optimization enabled us to define the optimal inter-plasmid ratio, DNA / cells ratio, transfection agent / DNA ratio and cell concentration at transfection to obtain the best productivity. The clarification study was carried out to minimize losses associated with this stage as shown in other studies. To increase yields, different lysis mix were tested. To define these optimal conditions, statistical analysis was done to determine the importance of each factor implemented into the design of experiment.

Alesia  
XEMAIRE

CP

SANOFI AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

VITRY SUR SEINE • FRANCE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : M. Arnaud BRISSON

10/3/2022 → 9/30/2023

Evaluation de l'impact du transfert de gaz et de la puissance volumique sur la performance de culture et sur la qualité de l'anticorps thérapeutique en cellules CHO.

Rapport confidentiel  
Soutenance confidentielle

CHO, Culture cellulaire, Anticorps, Ambr 250mL, Bioréacteur 5L

Ce rapport présente les résultats d'expériences de culture cellulaire en laboratoire réalisées en bioréacteur de 250 mL et de 5 L. L'anticorps thérapeutique est produit par des cellules génétiquement modifiées. Les données de performance de culture ainsi que la qualité de l'anticorps générées au cours de la phase de production en bioréacteurs ont été analysées afin de déterminer l'impact de la puissance volumique (Agitation) et du transfert de gaz (Aération). Il est alors apparu que l'augmentation de la puissance volumique entraînait une amélioration de la qualité de l'anticorps au prix d'une légère baisse de la productivité. L'augmentation du débit en O<sub>2</sub> injecté dans le milieu de culture induit une baisse de qualité de l'anticorps sans pour autant impacter la performance de culture (productivité, concentration en cellules viables...). L'augmentation de l'agitation et du débit de gaz doivent être définis de façon à optimiser la performance de culture ainsi que la qualité de l'anticorps. Ces travaux serviront au développement futur d'un modèle à petite échelle (Scale-Down Model) avec pour objectif de supporter la caractérisation du procédé final de culture cellulaire.

This report presents the results of cell culture experiments conducted in our laboratory using 250 mL and 5 L bioreactors. The therapeutic antibody is produced using a genetically modified cell line. The data generated during the production phase regarding the culture performances and the quality of the antibody produced were analyzed in order to determine the impact of the volumetric power (Stirring) and gas transfert (Airing). It appeared that the increase of the volumetric power improved the quality of the antibody while also triggering a slight decrease of the antibody production. The increase of the O<sub>2</sub> throughput within the culture medium induced a decrease in the antibody quality while having little to no effects on the culture performances (antibody production, viable cell density...). The stirring and O<sub>2</sub> throughput increase must be defined in order to maximize the culture performances as well as the quality of the antibody produced. The results of these experiments will be used in the future for the development of a small-scale model (Scale-Down Model) which will help with the characterization of the final cell culture process.

Thomas  
ZAGZOULE

CP