



PLANNING & RÉSUMÉS

SOUTENANCES
Stage de 2^{ème} ANNÉE
Année 2017-2018

7- 8 novembre 2018

48 INGENIEURS ENSTBB
PROMOTION 2019

SCHEDULE & ABSTRACTS

DEFENCES
2nd YEAR INTERNSHIPS
Year 2017-2018

November 7-8, 2018

48 ENSTBB ENGINEERS
CLASS OF 2019



IRLANDE / IRELAND

- LAMP Biomaterials (GALWAY)



ROYAUME-UNI / UNITED KINGDOM

- LONZA BIOLOGICS plc (CAMBRIDGE)
- VERNALIS (CAMBRIDGE)
- Cell Guidance Systems (CAMBRIDGE)



FRANCE / FRANCE

- LAFFORT (BORDEAUX)
- UMR 5297 (BORDEAUX)
- INSERM U1211 - Unité MRGM (BORDEAUX)
- INSERM U 1218 (BORDEAUX)
- TRIBVN (CHATILLON)
- NOVARTIS PHARMA SA (HUNINGHE)
- CEVA SANTE ANIMALE (LIBOURNE)
- UMR 7276 CNRS - INSERM U1262 - UNIVERSITÉ DE LIMOGES
- INNOBIOCHIPS (LOOS)
- GENZYME LYON (LYON)
- MERCK BIODEVELOPMENT (MARTILLAC)
- Laboratoire Excell (MERIGNAC)
- CILOA (MONTPELLIER)
- INSERM UMR 892 (NANTES)
- IFREMER (NANTES)
- Institut Européen de Chimie et Biologie IECB (PESSAC)
- CORDOUAN TECHNOLOGIES (PESSAC)
- CBMN (PESSAC)
- FLUOFARMA (PESSAC)
- CBMN UMR 5248 (PESSAC)
- BIORAD (SCHILTIGHEIM)
- SANOFI-AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT (STRASBOURG)
- INSERM U1056 UDEAR (TOULOUSE)



CANADA / CANADA

- PlantForm Corporation (GUELPH)
- TALBOT LABS (MONTREAL)
- LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS (MONTREAL)



ETATS-UNIS / UNITED STATES

- LAMP Biomaterials (BOSTON)



SUEDE / SWEDEN

- Swedish Algae Factory (GOTHENBURG)
- CELLINK (GOTHENBURG)



DANEMARK / DENMARK

- AALBORG University (AALBORG)



REPUBLIQUE TCHEQUE / CZECH REPUBLIC

- ARCHECK (PLZEN)



BELGIQUE / BELGIUM

- Bone Therapeutics SA (BRUXELLES)
- GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS (RIXENSART)
- CONFOTHERAPEUTICS (ZWIJNAARDE)
- APHEA BIO (ZWIJNAARDE)



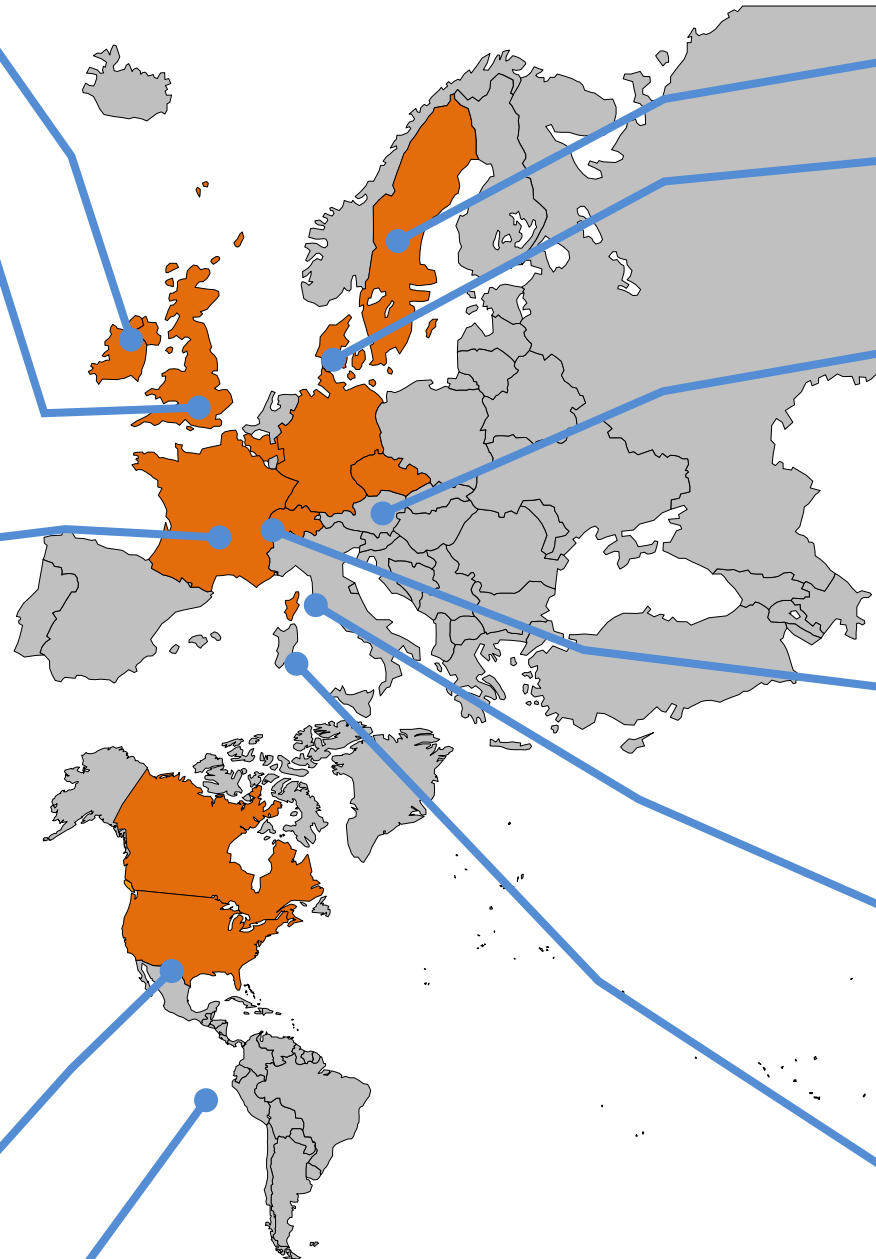
ALLEMAGNE / GERMANY

- SOLAGA AG (BERLIN)
- ORGANOBALANCE GmbH (BERLIN)
- Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH (LEIPZIG)
- SALATA AG (RITSCHENHAUSEN)



SUISSE / SWITZERLAND

- NOVARTIS (BASEL)
- BIOVERSYS (BASEL)
- GLENMARK PHARMACEUTICALS SA (LA CHAUX DE FOND)





Maelle ALLENDER

3A-CBI

Institut Européen de Chimie et Biologie IECB

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Denis DUPUY

Biosynthèse de FDCA à partir de co-produits issus de l'industrie du bois par une souche recombinante de *E. coli*.

La forêt des Landes située dans la région de Nouvelle Aquitaine est la plus grande forêt artificielle d'Europe. L'arbre le plus courant y est le pin maritime qui correspond à 25 pourcent de la production de bois en France. Cette industrie amène de nombreux co-produits recyclés mais une partie de ces co-produits n'est pas utilisée et représente une abondante quantité de biomasse.

Le projet de mon équipe IGEN Bordeaux est de se concentrer sur la transformation de cette biomasse en molécule plateforme, l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA), notamment utilisé pour fabriquer des biopolymères permettant la formation du bioplastique.

Trouver de nouvelles voies de production du FDCA pourrait permettre la réduction de l'utilisation de pétrole qui est pour le moment la source principale des plastiques. Cela pourrait considérablement limiter la pollution venant de cette utilisation abusive de pétrole.

La première partie de notre projet consiste à convertir chimiquement la cellulose en hydroxyméthylfurfural HMF, une autre molécule plateforme.

La deuxième partie de notre projet est basée sur l'insertion de trois gènes différents dans *E. coli*, permettant la catalyse du HMF en FDCA. Le HMF est une molécule toxique et des études ont montré que certaines souches de bactéries y étaient résistantes et étaient capables de transformer le HMF en FDCA. Nous avons choisi trois gènes qui sont HmfH de *C. basilensis*, HmfO de *P. putida* et AldH1 de *R. ornithinolytica*.

PESSAC • France

14/05/2018 → 20/10/2018



FDCA biosynthesis from by-products of the wood industry using a recombinant strain of *E. coli*.

The Landes forest in our region of Nouvelle Aquitaine is the biggest artificial forest in Europe. The most common tree in this forest is the maritime pine which accounts for 25 percent of the wood production in France. This wood production or other wood work brings many well recycled co-products but a part of waste still remains and represents a huge amount of biomass.

The project of the Igen Bordeaux team this year is to focus on the transformation of this biomass into some building block, the 2,5-Furandicarboxylic acid (FDCA) which is used to produce biopolymers, that one may develop bioplastics.

Finding new way to produce FDCA could reduce the use of oil which is currently the main source of plastic. It could significantly prevent the pollution derived from the improper oil use.

The first part of our project is to convert chemically cellulose into Hydroxymethylfurfural (HMF).

The second part of our project is based on the insertion of three different genes into *E. coli* to allow it to catalyze the transformation of HMF into FDCA. HMF is a toxic molecule and studies show that some strains are resistant to it and are able to transform HMF into FDCA. We choose three genes that are HmfH from *C. basilensis*, HmfO from *P. putida* and AldH1 from *R. ornithinolytica*.



Elodie ANDRIATSOALALAH

3A-Classique

BIORAD

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Séverine JAEGLÉ

Assistance aux activités du service Assurance Qualité: Spécifications techniques, homologations article-fournisseur et revues qualité

Bio-Rad Laboratories est une entreprise internationale qui fournit des produits et services à divers clients dans les domaines des sciences de la vie et du diagnostic clinique.

Le site de Schiltigheim a pour activité de concevoir et produire des instruments de diagnostic in vitro (IVD) qui doivent répondre aux normes en vigueur, évaluées par le Medical Device Single Audit Program (MDSAP). Cet audit s'appuie principalement sur la norme ISO 13485, encadrant la fabrication et la commercialisation des dispositifs médicaux orientées vers la satisfaction client. C'est dans ce cadre que j'ai assisté le service Assurance Qualité du site durant mon stage à travers deux projets.

Mon projet majeur a consisté à la rédaction de spécifications techniques des articles fournis à Bio-Rad, destinés à la fabrication de leurs instruments, ainsi qu'à la mise en place d'homologations article-fournisseur. Ce projet a également inclus la mise à jour de la procédure et la mise en place d'une formation du personnel en prenant en compte le projet d'harmonisation de nos activités avec le site de Roanne. Au terme de mon stage, un total de 2983 spécifications à faire a été défini, dont 380 ont été rédigées et validées. Une formation concernant la procédure mise à jour a été dispensée aux personnels concernés.

Mon second projet a été la participation à la mise en place de revues qualité des postes en atelier de production dans le cadre du MDSAP, et pour lequel le site a été audité au mois de juin. Il a obtenu la certification liée à cet audit, et des revues qualité sont à présent réalisées de manière régulière afin de rester en conformité avec les normes en vigueur.

Ces projets sont toujours en cours sous la responsabilité d'une apprentie que j'ai formé pour prendre la suite de ce travail.

SCHILTIGHEIM • France

02/05/2018 → 28/09/2018



Assistance to the activities of the Quality Assurance department - Technical specifications, product-supplier approvals and quality reviews

Bio-Rad Laboratories is an international company providing products and services to various customers in the fields of life sciences and clinical diagnostics.

The activity of the Schiltigheim site is to design and produce in vitro diagnostic instruments that must meet the current standards, evaluated by the Medical Device Single Audit Program (MDSAP). This audit is mainly based on the ISO 13485 standard, governing the manufacturing and marketing of medical devices oriented towards customer satisfaction. It is within this framework that I assisted the Quality Assurance department of the site during my internship through two projects.

My major project consisted of the writing of technical specifications of the parts supplied to Bio-Rad, intended for the manufacture of their instruments, as well as the implementation of product-supplier approvals. This project also included the update of the procedure and the implementation of staff training taking into account the project to harmonize our activities with the Roanne site. At the end of my internship, a scope of 2983 specifications have been defined, of which 380 have been written and validated. Training on the updated procedure was provided to the staff concerned.

My second project was the participation in the implementation of quality reviews of the workstations in the production workshop in the context of the MDSAP, and for which the site was audited in June. He has obtained the certification linked to this audit, and quality reviews are now carried out on a regular basis in order to remain in compliance with the current standards.

These projects are still in progress under the responsibility of an apprentice I trained to take over this work.



**Valentine
AUDONNET**

3A-CPRO

SALATA AG

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Claudia GREWE

Culture et extraction de *T. wisconsinensis* pour une application dans le secteur des cosmétiques.

Les algues forment un vaste groupe d'organismes rassemblant de nombreuses espèces dispersées dans divers habitats. Micro et macro algues sont d'ores et déjà étudiées comme potentielles sources d'énergie. Elles sont également utilisées dans l'industrie alimentaire comme épaississants ou colorants. Les algues sont également intégrées dans la formulation de produits cosmétiques comme agents hydratants ou épaississants mais elles sont rarement utilisées comme principes actifs. Elles semblent depuis quelques années de plus en plus intéresser les entreprises de cosmétiques. Certains composants de ces algues pourraient constituer les principes actifs de produits cosmétiques luttant contre des problèmes de peau tels que le vieillissement, le bronzage ou les problèmes de pigmentation.

Tetrademus wisconsinensis est une micro algue verte vivant dans l'eau douce. Cette espèce n'est étudiée que depuis peu de temps. Dans ce rapport *T. wisconsinensis* a été cultivée dans des conditions physiologiques et non-physiologiques, c'est-à-dire avec une déficience en nutriments comme facteur de stress. Les conditions de culture de *T. wisconsinensis* ont été ajustées afin d'augmenter sa productivité en antioxydants. L'efficacité de différents procédés d'extraction a été étudiée. Deux types d'extractions ont été utilisés : l'extraction à l'eau chaude et l'extraction à l'éthanol. Cette dernière a également été réalisée sans extraction à l'eau chaude préalable afin de mettre en évidence une possible dégradation des composants cellulaires. Ces extractions ont également été réalisées à partir de cellules lysées et de biomasse lyophilisée. La composition des extraits obtenus a été analysée de façon quantitative et qualitative. Des tests quantitatifs ont permis de déterminer la teneur en protéines, glucides, chlorophylles, caroténoïdes et antioxydants de ces extraits. Des chromatographies sur couche mince ont permis une analyse qualitative des glucides, antioxydants, pigments et aminoacides de ces extraits.

Les résultats montrent que la lyse des cellules augmente le rendement d'extraction et la teneur des composants d'intérêts qui ont été quantifiés. Chlorophylles et caroténoïdes sont principalement extraits avec l'éthanol.



**Sarah BAPST-
FERRET**

3A-Classique

NOVARTIS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Iwan BEUVINK

Expression, purification et caractérisation d'une enzyme: Vaccinia Capping Enzyme (VCE)

Les applications thérapeutiques impliquant l'usage d'ARN sont en plein essor, c'est pourquoi de plus en plus d'entreprises ont besoin de grandes quantités d'ARN pour mener à bien leurs études. Le coût de production d'ARN à grande échelle est l'un des inconvénients majeurs de mise en place du procédé, en raison du coût des enzymes utilisées pour ajouter la coiffe aux ARN. La coiffe en position 5' est nécessaire, entre autres, pour éviter la dégradation de l'ARN par les exonucléases ainsi que pour initier le mécanisme de traduction. L'objectif de ce projet était de produire en interne l'enzyme coiffante du virus de la vaccine (VCE) pour remplacer l'enzyme commerciale actuellement utilisée, vendue par New England Biolabs. L'enzyme VCE a été exprimée via la souche bactérienne Arctic Express, puis extraite de la fraction soluble par purification. L'activité de l'enzyme a été confirmée par des essais fonctionnels consistant à ajouter la coiffe (coiffe 0) à des ARN codant la GFP, suivi par la transfection de cellules HEK-293T par les ARN coiffés, puis l'observation de la fluorescence des cellules. Bien que l'enzyme produite soit active, les signaux de fluorescence observés sont moins intenses que ceux obtenus lorsque les ARN sont coiffés par l'enzyme commerciale. Des essais supplémentaires doivent encore être faits afin de déterminer si la différence d'activité est due à une diminution de l'activité enzymatique (efficacité d'addition de la coiffe) ou à la présence d'impuretés dans l'échantillon.

RITSCHENHAUSEN • Allemagne

07/05/2018→07/10/2018



Cultivation and extraction of *Tetrademus wisconsinensis* for cosmeceutical application

Algae are a wide group of organisms distributed over diverse habitats. Micro- and macroalgae are already studied as a potential source of energy and are moreover used in the food industry as thickeners or colorants. Algae are also incorporated in cosmetic formulations as moisturizing and thickening agents but they are rarely used as a source of primary active ingredients in cosmetics. However, they have recently drawn the attention of companies working in cosmetology. Algae metabolites and pigments could be used as active ingredients to fight against skin problems such as aging, tanning or pigment disorders.

Tetrademus wisconsinensis is a green microalga growing in fresh water. This type of microalga has started to be studied recently. In this study *T. wisconsinensis* was cultivated under physiological and non-physiological conditions i.e. with nutrient starvation as stress factor. Cultivation conditions were also adjusted to enhance the antioxidant productivity. The efficiency of different downstream processes on extraction was also studied. Two types of extractions were used one after another: hot water extraction and ethanolic extraction. Ethanolic extraction was both realised with and without hot water extraction beforehand in order to highlight the possible damaging of hydrophobic cell components. These extractions were also carried out with disintegrated cells and freeze-dried biomass. The composition of resulting extracts was analysed qualitatively and quantitatively. Quantitative assays were used to determine protein, carbohydrate, chlorophyll, carotenoid and antioxidant contents in the extracts. Qualitative analysis of carbohydrates, antioxidants, pigments and amino acids were performed by thin layer chromatography. The results show, that disintegration enhances both extract yield and the content of quantified valuable ingredients. Chlorophyll and carotenoid are mostly extracted with ethanol.

BASEL • Suisse

07/05/2018→28/09/2018



Expression, purification and characterization of Vaccinia Capping Enzyme (VCE).

Therapeutic applications involving RNA are on the rise. This is why companies need to have large amounts of RNA for their studies. One of the biggest issues of RNA large-scale process is the cost of production. One of the expensive elements is the enzyme used to cap RNA. The 5' cap is necessary to avoid RNA degradation by exonucleases and to initiate the translation mechanism. The objective of this project was to produce in-house vaccinia capping enzyme (VCE) to replace the capping enzyme currently bought from New England Biolabs (NEB). Here we show that VCE can be purified from the soluble fraction when expressed in the bacterial strain Arctic Express. We confirmed the activity of the purified VCE by performing RNA capping reactions (Cap 0) followed by transfection into HEK-293T and monitoring the expression of green fluorescent protein (GFP) in the cells. Although, the in-house produced VCE is active, the obtained fluorescence signals were much less intense compared to the RNA capped with commercial VCE. Additional characterizations needs to be done to establish whether the difference of activity is due to reduced enzyme activity (capping efficiency) or impurities that are still present in the sample.



**Louisa
BARTHELEMY**

3A-CBI

SOLAGA UG

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Benjamin HERZOG

Marketing et organisation d'une campagne de levée de fond pour le lancement d'un nouveau produit biotechnologique.

Solaga est une start-up allemande travaillant dans le domaine des biotechnologies qui étudie les biofilms et leurs nombreuses applications. J'ai participé au développement d'un purificateur d'air basé sur l'utilisation de biofilms, et plus spécifiquement sur une campagne de financement participatif permettant le lancement de ce produit.

Le financement participatif a été choisi pour collecter des fonds car cela permet d'atteindre une grande audience de manière simple. L'entreprise dans son ensemble ont été promus, et une stratégie de marketing du produit a été mise en place.

Au cours de ce stage, maximiser la portée de la communication de l'entreprise a été fondamental. Les réseaux sociaux, les partenaires de l'entreprise et la presse ont été sollicités. Des stratégies spécifiques ont été mises en œuvre sur différentes plateformes afin de d'analyser les besoins des futurs clients et d'atteindre notre objectif de levée de fond. Une nouvelle image d'entreprise communicant les projets de Solaga de manière attractive a été constituée. Cela comprend du texte, mais aussi des photos, des animations et une vidéo.

Ce nouveau support marketing permettra à l'avenir à Solaga de maintenir des clients permanents, de communiquer via une newsletter régulière à un public intéressé et d'optimiser leur produit en fonction des commentaires recueillis.

BERLIN • Allemagne

07/05/2018—05/10/2018



Marketing and crowdfunding campaign for the launch of a new biotechnology product

Solaga is a young german biotechnology start-up that studies biofilms and their numerous potential applications. My focus was on the development of a biofilm air purifier project, more specifically on the launch of this product through a crowdfunding campaign. Crowdfunding was chosen to raise money because of this process' public outreach and its simple implementation. It also allows us to build up a company image and promotes the company as a whole as well as advertising for the product.

During this internship maximising our outreach was fundamental. Hence tools such as emailing, social media, networking and the press we solicited. Specific strategies were put into action on different platforms in order to collect feedback and meet our funding goal. The entire company image was revised and lots of new material was created in order to communicate Solaga's projects in a more appealing way. This content involves not only text, but photos, animations and a video.

In the future, the data gathered by the crowdfunding will allow Solaga to maintain permanent clients, to communicate through a regular newsletter to an interested audience and to optimize their product according to the collected feedback.



**Emmanuelle
BAUDU**

3A-Classique

AALBORG University

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Jeppe LUND NIELSEN

Potentielle dégradation microbienne du polypropylène dans les boues activées des digesteurs anaérobies

La pollution de l'environnement par les plastiques est un problème mondial récent. La bioremédiation du plastique par des microorganismes pourrait être solution. De nombreuses études ont été effectuées pour essayer de comprendre la capacité des microorganismes à dégrader le plastique. L'équipe que j'ai intégrée a choisi de travailler avec un environnement particulièrement riche en microorganismes : les boues activées venant des stations d'épuration et utilisées pour la digestion anaérobie. Le polypropylène (PP) fut le plastique choisi, en raison des résultats de dégradation positifs obtenus précédemment. Au cours de ce projet, des morceaux de PP furent incubés dans de la boue activée pendant 14 jours et le biofilm formé sur les morceaux de PP fut séquenté et comparé à la composition en microorganismes de la boue activée. D'autres techniques furent employées pour analyser les morceaux de PP : la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage (SEM), la microspectroscopie raman et la résonance nucléaire magnétique (RMN). Les produits de dégradation du PP furent caractérisés par microspectroscopie raman et RMN. La rugosité de la surface du plastic fut mesurée par AFM, et la SEM permit de visualiser la dégradation du plastique et les microorganismes présents à la surface du PP.

AALBORG EAST • Danemark

07/05/2018—20/09/2018



Putative microbial degradation of polypropylene in anaerobic digester sludge.

Environment pollution by plastic waste is a recent global issue. Bioremediation of these plastics by microorganisms is a potential solution. Numerous studies have been done to try to understand microbial capacities to degrade plastic. The team I joined chose to work with a specific environment rich in microorganisms: the anaerobic digester (AD) sludge from sewage treatment plants. Polypropylene (PP) was chosen for having shown some positive degradation results previously. In this project, PP pieces were incubated in AD sludge for 14 days and the biofilm formed on PP pieces was sequenced and compared to the microbial composition of AD. Other techniques were used to analyse PP pieces: atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), raman microspectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). By-products of PP were characterised by raman microspectroscopy and NMR. The roughness of the plastic surface was measured with AFM, and SEM allowed the visualisation of plastic damage and microorganisms on the surface of PP pieces.



Hannah BELIN

LONZA BIOLOGICS plc

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

Production d'une ribonucléase pancréatique humaine Rnase-1 dans les cellules CHO GS-KO de Lonza

Les ribonucléases, ou Rnases pancréatiques sont des endonucléases sécrétées par le pancréas. L'équipe APS (Applied Protein Service) de Lonza utilise actuellement une Rnase-A dans les kits fournis par Qiagen afin de purifier leurs plasmides lors de la construction de vecteur, ou lors de l'amplification de la quantité d'ADN (Gigaprep®, Maxiprep®, Miniprep®). Or, cette ribonucléase fournie par Qiagen contient beaucoup d'impuretés et est extraite du pancréas bovin. Etant donné le fait que l'équipe APS produit des anticorps thérapeutiques pour certains clients, la nécessité d'avoir un procédé de production sans utilisation de produits d'origine animale s'est avérée de plus en plus importante. Le but de ce projet était donc de produire une Rnase disponible en grande quantité, qui puisse se purifier aisément afin d'obtenir un produit plus pur que la Rnase fournie par Qiagen, qui a la même activité, et qui pourtant n'est pas d'origine animale. Ainsi, 5 différentes Rnases furent produites dans les cellules CHO-GS-KO de Lonza afin d'avoir une première approche sur deux méthodes de purification (Streptavidine-tag et Histidine-tag), mais aussi pour tester l'effet de deux mutations différentes (une mutation menant à la déglycosylation des Rnases produites, et une autre permettant d'augmenter leur sécrétion). Les gènes de ces protéines furent intégrés au vecteur standard de Lonza pXceed 17.4, avant d'effectuer une transformation bactérienne avec ce plasmide. La quantité d'ADN fut amplifiée en cultivant ces bactéries, puis extraite avant la transfection des cellules CHO de manière transitoire puis stable par électroporation. Ces dernières furent ensuite élargies en volume plus conséquents par procédé Fed-Batch. La purification des Rnases produites a démontré que le tag Streptavidine n'était pas adapté à la purification de quantités importantes de protéines, en plus d'être une méthode de purification très coûteuse. Au contraire, la purification avec le tag Histidine était bien moins chère, adaptée à la purification de grandes quantités de protéines et assez pure. En effet, l'activité des différentes Rnases fut testée et comparée à celle fournie par le kit Qiagen et s'est avérée être identique (pas d'influence du tag). Dans la continuation du projet, il fut décidé de produire une nouvelle Rnase avec un tag histidine plus long afin d'améliorer le procédé de purification. En conclusion, il a été démontré l'efficacité de production et purification d'une Rnase sécrétoire dans les cellules CHO GS-KO, pouvant remplacer la Rnase d'origine bovine fournie dans les kits Qiagen. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une évolution de l'entreprise vers une suppression des produits d'origine animale dans la production de vecteur chez Lonza.

CAMBRIDGE • Royaume-Uni

01/05/2018—28/09/2018

Lonza



Production of a recombinant human pancreatic Rnase-1 in Lonza engineered CHO-cells

Pancreatic ribonucleases (Rnases-A family) are endonucleases secreted by the pancreas whose substrate is RNA. In the APS (Applied Protein Service) team in Lonza, Rnase-A is currently used in Qiagen Kits for plasmid purification during the vector construction and DNA amplification (Gigaprep®, Maxiprep®, Miniprep®). However, the Rnase-A provided in Qiagen kits contains a lot of impurities and is extracted from bovine pancreas. As the APS team produces therapeutic antibodies, it has become more and more important to be completely animal-free in the antibody production process in order to avoid any harmful reaction in future patients. The aim of the project was therefore to produce an Rnase available in large quantities, that can be easily purified to obtain a pure and animal-free protein that has the same activity as the Qiagen Rnase. Thus, 5 different Rnases were produced in Lonza engineered CHO cells in order to have an overview of two different purification process (Streptavidin and Histidine tags), and test the consequences of two different mutations (a deglycosylation mutation and a Serine mutation to increased secretion). The genes of these proteins were ordered and inserted into Lonza standard pXceed 17.4 Vector, before using it to transform bacteria. DNA was amplified by growing bacteria and extracted in order to transfect transiently CHO-cells and generate stable pools. These stable pools were then expanded to Fed-Batch Overgrown cultures. Purifications of the different products revealed that the Streptavidin-tag was not adapted to large-scale production and was also very expensive. The His-tag purification was much cheaper and quite pure. Furthermore, both Streptavidin and Histidine-tagged Rnases had the same activity as the Qiagen Rnase and the same effect in Qiagen kits. Therefore, it was decided to develop an Rnase with a longer histidine tag in order to improve the purification process. The project demonstrated that secreted Rnase can be produced and purified easily in GS-KO CHO cells and can be substituted for the supplied Bovine Rnase in Qiagen kits. This project will support the drive toward totally animal component-free vector production in Lonza.



Elina BERNOUD

ORGANO BALANCE GmbH

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Alexandra MATTERN**

Détermination du mode d'action des lactobacilles capable d'inhiber Escherichia coli entéro-toxigénique.

Escherichia coli entérotaxigénique (ETEC) provoque la diarrhée chez les enfants des pays en développement et chez les voyageurs. La diarrhée est la 4e cause de mortalité des enfants de moins de 5 ans, ce qui représente 5,8 millions d'enfants en 2015 (Global Burden of Disease Study, 2015). Environ 300 000 à 500 000 décès sont dus à l'ETEC dans le monde (Koloff et al, 2017). D'autre part, de 30% à 70% des voyageurs internationaux souffrent de diarrhée (tourista), ce qui représente plus de 15 millions de voyageurs par an (Steffen, 2005). ETEC se retrouve dans plus de 50 % des selles (Heather, 2015). Comme nouvelle alternative aux traitements antibiotiques, certains lactobacilles, souches probiotiques, ont un effet inhibiteur contre ETEC. J'ai été recruté pour déterminer le mode d'action de ces lactobacilles pour inhiber ETEC.

3A-CPRO

BERLIN • Allemagne

14/05/2018—21/09/2018



Determination of the mode of action of lactobacilli able to inhibit enterotoxigenic Escherichia coli strains.

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) induces diarrhea in children in developing countries and in travelers. Diarrhea is the 4th under-5 mortality which represents 5,8 million children in 2015 (Global Burden of Disease Study, 2015). About 300 000-500 000 death in children are due to ETEC worldwide (Koloff et al, 2017). Moreover, from 30% to 70% of international travelers develop diarrhea accounting for more than 15 million travelers per year (Steffen, 2005). ETEC is found in more than 50% stool of them (Heather, 2015). As new alternative to antibiotic treatments, some lactobacilli, potential probiotic strains, have an inhibitory effect against ETEC. I was enrolled to determine the mode of action of these lactobacilli to inhibit ETEC.



Charlotte BORIES

3A-Classique

CONFOTHERAPEUTICS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Vanessa WEHBI**

Génération de lignées cellulaires stables exprimant un RCPG d'intérêt pour le développement d'essais cellulaires permettant d'étudier l'activité biologique de potentiels médicaments candidats pour un traitement anti-fibrotique.

Confo Therapeutics développe des méthodes pour identifier des Confobodies, c'est-à-dire des fragments constitués du domaine variable des anticorps de camélidés qui stabilisent des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans la conformation désirée. La technologie Confobody permet de bloquer un RCPG dans une conformation définie pour identifier des agonistes spécifiques de ces conformations. Confo Therapeutics travaille sur différents RCPG dont un étudié en tant que cible pour le développement d'un traitement anti-fibrotique. La fibrose est une maladie inflammatoire chronique qui cause de sévères dysfonctionnements des organes atteints et peut conduire à la mort des patients. Le but de mon projet était de générer deux lignées stables exprimant le RCPG d'intérêt afin de les utiliser pour le développement de deux essais cellulaires différents : le recrutement des β -arrestines et l'internalisation du récepteur. Ces essais aideront à caractériser de nouveaux potentiels traitements ciblant le RCPG d'intérêt. Tout d'abord, nous avons transfecté des lignées cellulaires HEK 293 EA et U2OS avec le RCPG d'intérêt cloné dans le vecteur d'expression adéquat. Ensuite, nous avons conduit un premier essai de génération de lignées stables par une méthode de dilutions sérielles et sous la pression sélective de l'antibiotique Geneticin. Après deux mois de culture sous pression antibiotique, nous avons pu générer des lignées HEK 293 EA et U2OS stables. La fonctionnalité des clones HEK 293 EA-RCPG et des clones U2OS-RCPG fut testée avec les essais de recrutement des β -arrestines et d'internalisation du récepteur respectivement. Après activation par des agonistes, la capacité des cellules à recruter les β -arrestines et à internaliser le récepteur fut mesurée par luminescence. Malheureusement, aucun des 33 clones HEK 293 EA-RCPG ni aucun des 111 clones U2OS-RCPG testés ne montrèrent une activité biologique. L'expression du RCPG ciblé à la membrane des cellules fut également vérifiée par cytométrie en flux mais, là encore, aucune expression membranaire du récepteur ne fut détectée ni pour les HEK 293 EA ni pour les U2OS. Etant donné l'échec de la méthode, toutes les étapes suivies pour la génération des lignées stables furent revues. Parmi toutes les vérifications effectuées, le séquençage du vecteur d'expression utilisé pour la transfection montra l'absence de la séquence du RCPG cible dans le plasmide. En conséquence, toute la procédure fut recommencée depuis le début en utilisant un nouveau vecteur d'expression contenant la séquence du RCPG. Des lignées cellulaires stables furent générées et les cultures de HEK 293 EA-RCPG et U2OS-RCPG sont actuellement en cours. En parallèle, l'expression et la fonctionnalité du RCPG furent confirmées par l'essai de recrutement des β -arrestines dans les lignées HEK 293 EA transfectées transitoirement. Ces résultats prometteurs nous donnent l'espoir de pouvoir prochainement générer les lignées stables désirées. Ces outils seront utilisés pour caractériser de nouveaux agonistes candidats ciblant le RCPG d'intérêt et aideront Confo Therapeutics à développer des traitements innovants et efficaces de la fibrose.

ZWIJNAARDE • Belgique

02/05/2018 → 27/09/2018



Generation of stable cell lines expressing a targeted GPCR for cell-based assays development to monitor biological activity of potential drug candidates in anti-fibrotic treatment.

Confo Therapeutics develops tailored methods to identify Confobodies, which are camelid single domain antibodies that stabilize the desired signaling conformation of G-protein coupled receptors (GPCR). The Confobody technology allows to lock GPCR into defined conformations and identify specific agonists of these conformations. Confo Therapeutics works on different undruggable GPCR, one of them is a target for the anti-fibrotic therapy. Fibrosis is a chronic inflammatory disease, which causes severe organ malfunctions that may lead to death. The aim of my project was to generate two stable cell lines expressing the targeted GPCR, which will be used to develop two different cell-based assays: the β -arrestin recruitment and the receptor internalization assays. These assays will help to characterize new potential drugs targeting the GPCR of interest. Firstly, the targeted GPCR cloned into a suitable expression vector was transfected into both engineered HEK 293 EA and U2OS cell lines. Secondly, a first attempt of stable cell lines generation was conducted through serial dilution method and under selective antibiotic pressure using Geneticin. After two months of selective pressure HEK 293 EA and U2OS monoclonal cells were generated. The functionality of HEK 293 EA-GPCR clones and U2OS-GPCR clones was tested in β -arrestin recruitment assay and internalization assay, respectively. Upon agonist activation, the β -arrestin recruitment and the receptor internalization capacity were measured by luminescence. Unfortunately, despite 33 HEK 293 EA-GPCR clones and 111 U2OS-GPCR tested, none of monoclonal cells showed biological activity. The cell surface expression of the targeted GPCR was simultaneously control by flow cytometry but, here again, no receptor expression was detected at the plasma membrane of both HEK 293 EA and U2OS cells. Given the failure of the method, all steps used to generate the stable cell lines were reviewed. Of the audits, sequencing of the vector of expression used for transfection showed the lack of the targeted GPCR sequence into the plasmid. Consequently, the whole procedure had to be started all over again using the new expression vector with confirmed presence of the targeted GPCR sequence. Stable cell lines were generated, and culture of HEK 293 EA-GPCR and U2OS-GPCR are now ongoing. In parallel, the expression and functionality of the GPCR were confirmed in transiently transfected HEK 293 EA cells with the β -arrestin recruitment assay. These promising results give us hope to generate soon the two desired stable cell lines. These tools will be used to characterize new candidate agonists targeting the GPCR of interest and will help Confo Therapeutics to find innovative and effective drugs in anti-fibrotic treatment.



Delphine CLOAREC

3A-CPRO

Université de Warwick

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **André PIRES DA SILVA**

Etude de la détermination sexuelle chez une espèce trioïque.

Les nématodes sont une espèce animale présentant l'une des plus grande diversité phylogénique et sont des sujets d'études particulièrement intéressants en génétique et dans la science de l'évolution. *Caenorhabditis elegans* est une espèce de nématode androdioïque (mâle/hermaphrodite) bien connue servant de référentiel à l'étude de la détermination sexuelle. L'équipe du Dr Pires da Silva étudie des espèces nouvellement isolées qui pourraient éclairer l'évolution de la détermination sexuelle. Le nématode *Auanema rhodensis* est une espèce trioïque dont les femelles et les hermaphrodites ont une apparence identique à l'âge adulte et ne peuvent être distingués seulement par la capacité à produire du sperme ; tandis que les mâles sont clairement différents. Afin de comprendre comment s'effectue la détermination des sexes femelle et hermaphrodite, l'équipe a analysé le transcriptome des larves et a découvert que le gène *dmd-10/11* était largement surexprimé chez les larves devenant hermaphrodites. Dans le cadre de mon stage, j'ai donc été amenée à poursuivre cette étude et à confirmer le rôle de ce gène dans la détermination sexuelle de cette espèce de vers microscopique. Pour cela, j'ai dû isoler l'ARN correspondant à ce gène *dmd-10/11* et j'ai procédé à des micro-injections sur nématodes afin d'inhiber, par ARN interférence, le gène en question. J'ai ensuite analysé la descendance de ces vers afin de conclure quant au rôle du gène *dmd-10/11*.

COVENTRY • Royaume-Uni

10/05/2018 → 09/09/2018



Study of sex determination in a trioecious species.

Nematodes belong to one of the most diverse animal phyla and are particularly suited to study genetics and evolution. *Caenorhabditis elegans* is a well-known androdioecious (male/hermaphrodite) nematode species used as a model of reference to study sex determination. Dr Pires da Silva and his team study newly isolated species that may shed some light on the evolution of sex determination. The nematode *Auanema rhodensis*, for example, is a trioecious nematode (it has three sexes, male, female, and hermaphrodite) where females and hermaphrodites have the same physical appearance at the adult stage and can only be distinguished by the ability to produce sperm or not, whereas males are clearly different. To understand how the sex is determined between female and hermaphrodite, the team analysed the transcriptome of larvae and found that the gene *dmd-10/11* is largely overexpressed in developing hermaphrodite larvae. During my internship, my aim was to confirm the role of *dmd-10/11* in the sexual determination of this worm species. In order to do this, I isolated the RNA corresponding to *dmd-10/11* and I proceeded to microinjections on nematodes to inhibit, using RNA interference, this gene. Then, I analysed the progeny of these worms to conclude about the role of *dmd-10/11* in sex determination.



Gaston CLUZEL

3A-CBI

LAFFORT

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Marion FAVIER

Mise en place d'un test de sélection de souches d'Oenococcus oeni performantes pour réaliser la fermentation malolactique.

La fermentation malolactique (FML) intervient après la fermentation alcoolique lors de l'élaboration de la plupart des vins. Ce processus contribue à l'amélioration des propriétés aromatiques du breuvage, à sa désacidification et à sa stabilité microbiologique.

Cette fermentation est naturellement réalisée par la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, une espèce capable d'une grande adaptabilité mais extrêmement diversifiée. Toutes les souches ne sont pas capables de conduire la FML spontanément, causant régulièrement des retards et arrêts de fermentation qui peuvent conduire à l'altération du vin par d'autres espèces microbiennes. Induire la FML avec des levains malolactiques, souches bactériennes sélectionnées pour leurs performances œnologiques, permet de raréfier ces incidents et de maîtriser le processus.

C'est dans ce contexte qu'un projet de sélection bactérienne a été initié par l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) de Nantes en partenariat avec BIOLAFFORT. Pour cela, des centaines de souches d'*O. oeni* ont été isolées et identifiées génétiquement. Elles seront sélectionnées selon des critères génétiques et phénotypiques pour une étude de faisabilité industrielle, dans le but de commercialiser de nouveaux levains malolactiques.

Mon projet a pour but de mettre en place un test de sélection de souches performantes pour réaliser la FML. Ce test consiste à évaluer l'activité fermentaire des souches en conditions standardisées et discriminantes.

Le développement du test a débuté par la formulation du milieu dans lequel l'activité fermentaire sera suivie. Deux milieux de fermentation ont permis une sélection efficace des souches, leurs paramètres nutritionnels et physico-chimiques sont proches de ceux rencontrés en œnologie. Le test d'activité malolactique a ensuite été développé mais ses paramètres doivent encore être ajustés afin de garantir la reproductibilité de ses résultats.

Une fois valide, le test permettra d'étudier une grande quantité de souches et d'accélérer le processus de sélection.

BORDEAUX • France

02/05/2018—28/09/2018



Development of a selection test for *Oenococcus oeni* strains efficient at conducting malolactic fermentation

Malolactic fermentation (MLF) occurs after the alcoholic fermentation during winemaking. This process contributes to the enhancement of the organoleptic properties of the wine, as well as its decacidification and microbial stability.

This fermentation is naturally performed by the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, a species showing great adaptation skills but a large intraspecific diversity. All strains are not able to conduct MLF efficiently, causing delays or stuck fermentations and potentially leading to wine spoilage by other microbial species. To avoid these issues, bacterial strains can be selected for their enological performances and used as malolactic starters.

It is within this scope that a bacterial selection project has been launched by the Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) de Nantes, in partnership with BIOLAFFORT. Hundreds of *O. oeni* strains were isolated and genetically identified. They will be selected according to genetic and phenotypic criteria for an industrial feasibility assessment, in order to commercialize new malolactic starters.

My project aims at developing a selection test for MLF efficient strains. This test consists in the evaluation of the malolactic activity of different strains in a standardized and selective environment.

The test development started with the formulation of the medium in which the malolactic activity will be monitored. Two fermentation media showed a great selectiveness, their nutritional and physico-chemical conditions were close to real wines. The test was then developed but its parameters still have to be adjusted in order to guarantee the reproducibility of its results.

Once valid, the test will enable the assessment of numerous strains and accelerate the selection process.



Anaïs CORNEBOIS

3A-CBI

INSERM U1056 UDEAR

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Nathalie JONCA

Mise en place et caractérisation de modèles cellulaires et d'outils immunologiques pour l'étude d'une lipase de l'épiderme – Approche CRISPR-Cas9.

L'épiderme forme une barrière naturelle essentielle dans la protection de l'organisme contre la déshydratation et les agressions physiques, chimiques ou biologiques. Les lipides des couches supérieures de l'épiderme, en majorité des céramides, ont un rôle majeur dans l'homéostasie de cet épithélium. Les ARCI (Ichtyoses Congénitales Autosomiques Récessives), sont des maladies monogéniques rares de la peau causées par des mutations de gènes codant pour des facteurs impliqués dans le métabolisme des ω -O-acylcéramides. Un des gènes identifiés code pour une lipase acide de l'épiderme, la lipase N (LIPN), dont le rôle est encore mal connu.

Mon projet a consisté à la mise en place de modèles cellulaires et d'outils immunologiques pour la caractérisation fonctionnelle de LIPN au niveau de l'épiderme. Premièrement, des anticorps dirigés contre cette protéine ont été purifiés et caractérisés par Western Blot, ELISA et immunofluorescence. Ces anticorps ont permis de vérifier l'expression de LIPN dans des épidermes humains reconstruits, validant ainsi ce modèle cellulaire 3D pour l'étude de l'enzyme. Enfin, la technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée pour obtenir des kératinocytes primaires humains en culture immergée invalidés pour le gène LIPN. Ces cellules serviront à développer un modèle cellulaire organotypique déficient en LIPN dédié à l'étude du rôle de la lipase dans l'épiderme.

TOULOUSE • France

02/05/2018—28/09/2018



Development and characterization of cellular models and immunological tools for the study of an epidermal lipase.

Epidermis constitutes a natural barrier which is essential to protect organism from dehydration and physical, chemical or biological aggressions. The lipids of upper layers of the epidermis, which are mainly ceramides, have a major role in the epidermal homeostasis. ARCI (Autosomal Recessive Congenital Ichthyoses) are rare monogenic skin diseases caused by mutations in genes encoding factors involved in ω -O-acylcéramides metabolism. One of these genes codes for an epidermal acid lipase called lipase N (LIPN) whose role remains little known.

My project consisted in the development of cellular models and immunological tools for the functional characterization of LIPN in the epidermis. First antibodies against this protein were purified and characterized. Next, thanks to these antibodies the expression of LIPN in reconstructed human epidermis could be verified, thus validated this 3D cellular model for the study of the enzyme. Finally CRISPR-Cas9 technology was chosen to obtain primary human keratinocytes invalidated for LIPN in immersed culture. These cells will be used to develop an organotypic cellular model deficient in LIPN dedicated to the study of the lipase in the epidermis.



Emeline COSSON

3A-CBI

Swedish Algae Factory

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Mikael HEDBLOM

Optimisation et suivi d'une culture de micro-algues à deux échelles différentes.

L'intérêt croissant envers les organismes marins s'expliquent par la compréhension de leur rôle dans le cycle des éléments et par les nombreuses découvertes sur leur génome. Les algues, entre autre, de par leurs propriétés possèdent des applications dans le domaine des biotechnologies et plus particulièrement dans celui de l'écologie ; les diatomées sont un exemple d'algues produites pour des fins écologiques. Au sein de Swedish Algae Factory, le but est de les cultiver en utilisant un modèle économique circulaire où tout élément est réutilisé afin de limiter les pertes. Les objectifs sont divers : traitement des eaux usées, production de biofuel mais surtout production de silice, composé à forte valeur ajoutée. Ces micro-algues sont entourées d'une capsule composée essentiellement de silice ; il est donc d'intérêt industriel de pouvoir les produire en grande quantité afin de récupérer la silice. Au cours de ce stage, mon projet a eu pour premier objectif d'optimiser la croissance des algues utilisées par l'entreprise à l'échelle laboratoire ; pour cela j'ai basé mon travail sur la construction d'un plan d'expérience à l'aide du logiciel RStudio® ; d'une part pour étudier différents facteurs pouvant avoir un impact sur la culture et d'autre part pour déterminer les conditions de culture à imposer pour obtenir le plus de biomasse possible. La seconde partie du projet a eu pour but de faire un suivi de culture à l'échelle production sur différents plateaux de culture et de les comparer afin de mettre en avant les facteurs externes ayant un impact sur la croissance des micro-algues.

GOTHENBURG • Suède

07/05/2018 → 21/09/2018



Optimization and monitoring of a microalgae culture at two different scales.

Interest in marine organisms has increased due to the comprehension of their essential role in global element cycles but also owing to the rise in the amount of genomic information. Thanks to their properties, microalgae have numerous applications in the field of biotechnology and especially in the one of ecology. Diatoms are example of microalgae produced for ecologist's end. Within Swedish Algae Factory, the aim is to cultivate them using a circular economic system where each element is recycled in order to reduce losses. The endings of this process are multiple: waste water treatment, production of biofuel but mainly production of silica, value-added component. Diatoms are surrounded by a shell essentially composed of silica; then, it is of industrial interest to be able to produce them in high quantity in order to pick up the silica. During this internship, my project had for first purpose to optimize the growth of the microalgae used by the company at the laboratory scale; to achieve this goal I based my work on a statistical experimental design using the software RStudio®; first in order to study several factors that could have a potential impact on the culture and secondly to determine the conditions where the higher biomass is obtained. The second part was devoted to the culture monitoring at the production scale of different culture trays and to their comparison in order to put forward the external factor that impact the growth of microalgae.



Manon COURSIERES

3A-Classique

UMR 5297

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Matthieu SAINLOS

Evolution dirigée de fragments d'anticorps synthétique pour l'imagerie.

L'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS) est un laboratoire pluridisciplinaire académique, basé sur un partenariat entre le Centre National de Recherche Scientifique et l'Université de Bordeaux, ayant pour objectif le développement de méthodes et outils innovants s'inscrivant dans une dynamique de compréhension des mécanismes cérébraux. Au cours de mon stage, j'ai eu l'opportunité de prendre part aux travaux du docteur Matthieu SAINLOS visant à développer de nouveaux outils moléculaires utilisables en microscopie.

L'émergence des techniques d'imagerie de super-résolution a créé un besoin pressant de nouvelles méthodes de marquage des protéines d'intérêt. En effet, les méthodes habituellement utilisées ne sont pas nécessairement adaptées à ces dernières. À titre d'exemple, le marquage de protéines endogènes est typiquement réalisé par l'utilisation d'anticorps (quand ces derniers sont disponibles pour une cible donnée) ; or, en raison de leur taille et de leur multivalence, leur utilisation limite grandement la précision de localisation de leurs cibles et peuvent induire des artefacts par réticulation. De même, le recours à des fusions génétiques impose dans la plupart des cas l'insertion de domaines protéiques de grande taille (e.g., GFP > 20 kDa) pouvant altérer la fonctionnalité de la protéine.

Dans ce contexte, mon projet a consisté à utiliser une approche multidisciplinaire combinant évolution dirigée, biophysique et ingénierie des protéines afin de développer de nouveaux outils moléculaires de petite taille qui permettront de marquer efficacement et sans les perturber un ensemble de protéines représentatives en vue d'applications en imagerie de super-résolution. Dans un premier temps, une stratégie de sélection à partir d'une banque de fragments synthétiques d'anticorps par phage display (basée sur l'exposition de variants protéiques à la surface du bactériophage M13) a été mise en place afin d'isoler des variants capables de reconnaître spécifiquement et efficacement des épitopes de petite taille. Les meilleurs candidats ont été identifiés par tests ELISA et séquençage. Dans un deuxième temps, pour les clones présentant les propriétés attendues, mon travail a consisté à déterminer leurs conditions d'expression optimales en utilisant notamment différents vecteurs d'expression et caractériser leurs propriétés d'interactions avec leur cible.

BORDEAUX • France

22/05/2018 → 29/09/2018



Directed evolution of synthetic antibody fragments for imaging.

The Interdisciplinary Institute of Neuroscience (IINS) is a multidisciplinary academic laboratory, based on a partnership between the National Center for Scientific Research and the University of Bordeaux, aiming at the development of innovative methods and tools pursuing a dynamics of understanding of the cerebral mechanisms. During my internship, I had the opportunity to take part in the work of Dr. Matthieu SAINLOS in order to develop new molecular tools for microscopy.

The emergence of super-resolution imaging techniques has generated greater pressure for new methods of labeling proteins of interest. Indeed, the usual methods are often not suitable for them. For instance, the labeling of endogenous proteins is typically achieved by the use of antibodies (when these are available for a given target). However, because of their size and their multivalence, their uses significantly limit the location accuracy of their targets and can induce artifacts by crosslinking. Furthermore, in most cases, the use of genetic fusions requires the insertion of large protein domains (e.g., GFP > 20 kDa) that may alter the functionality of the protein.

In this context, my project was to use a multidisciplinary approach combining directional evolution, biophysics and protein engineering to develop new molecular tools that will effectively label proteins without disturbing them in order to use them for super-resolution imaging applications. Firstly, a phage display selection strategy (based on the exposure of protein variants to the bacteriophage M13 surface) was implemented using a library of synthetic antibody fragments in order to isolate variants able to specifically and efficiently recognize small epitopes. The best candidates were identified by phage-ELISA and sequencing. Second, for the most promising clones, my work has consisted in determining their optimal expression conditions, notably by using various expression vectors, and in characterizing their interactions properties with their target.



Léo DELMARRE

3A-Classique

CORDOUAN TECHNOLOGIES

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **David JACOB**

Mise au point expérimentale d'une technique optique pour la caractérisation d'objet submicronique en milieu biologique/ aqueux.

Cordouan Technologies est une entreprise créée en 2007 par David Jacob et Mathias Pennec. L'entreprise a développé des solutions innovantes pour la caractérisation de nanoparticules et de nanomatériaux et offre maintenant un large éventail d'instruments pour la Granulométrie, la Réfractométrie, l'Electrophorèse et la Microscopie Electronique. Leur expertise leur a valu de devenir une référence dans le monde des nanoparticules. Pour rester compétitive, Cordouan Technologies doit continuellement développer des instruments de mesure innovants tout en continuant d'améliorer ceux qu'ils ont déjà commercialisés. Le Wallis, un instrument commercialisé par Cordouan, est un appareil spécialisé dans la caractérisation de la mobilité des nanoparticules, basé sur le principe de l'électrophorèse laser Doppler. Mon rôle durant ce stage fut de tester la validité de cette méthode pour des dispersions concentrées en utilisant différents outils de caractérisation. Pour ce faire, je me suis intéressé au transport des nanoparticules et aux transferts de charges aux interfaces sur des milieux soumis à un champ électrique. L'étape préliminaire dans une telle démarche fut de développer une cellule d'échantillon conçue à la fois pour effectuer des mesures optiques et électrochimiques. La cellule d'échantillon devait également être plus fine que les cellules d'échantillon conventionnelles précédemment développées par Cordouan pour obtenir une meilleure clarté optique. Une fois fonctionnelle, la cellule d'échantillon a été utilisée pour lancer des expérimentations sur un échantillon de nanoparticules type, le LudoxTMS0, constitué de particules de silicate dans une solution saline. J'ai effectué trois types d'analyses: (i) une caractérisation optique à l'aide d'un microscope de phase quantitative et une caractérisation électrochimique par (ii) voltamétrie cyclique et par (iii) spectroscopie d'impédance. Je me suis servi de modèles électriques tels que le circuit de Randles pour modéliser les réactions impliquées dans les solutions d'électrolyte ainsi que le modèle de Debye-Hückel pour faire le lien entre les mesures de conductivités et les mobilités des particules. J'ai réussi à extraire des informations intéressantes sur la mobilité des nanoparticules dans une gamme de potentiels électrophorétiques où les transferts de charges aux surfaces sont négligeables. Ces résultats m'ont permis de discuter les observations faites sur les mesures du Wallis et d'orienter le prototypage de la cellule d'échantillon en vue du développement d'un nouvel instrument.

PESSAC • France

02/05/2018—31/08/2018



Experimental set-up of a new optical technique dedicated to the characterization of submicronic objects in aqueous/biological medium.

Cordouan Technologies is an enterprise created in 2007 by David Jacob and Mathias Pennec. This enterprise has developed innovative solutions for the characterization of nanoparticles and nanomaterials and is now offering a broad portfolio of instrument solutions for Granulometry, Refractometry, Electrophoresis and Electronic Microscopy. Their expertise earned them to become a reference in the world of nanoparticles. In order to keep competitive, Cordouan Technologies has to continuously develop innovative measurement instruments and keep improving the ones they have already commercialized. The Wallis, an instrument commercialized by Cordouan, is a device specialized in the characterization of nanoparticles mobility based on the principle of laser Doppler electrophoresis. My role during this internship was to test the validity of such a method in the case of concentrated dispersion, using different characterization tools. To that end, I took interest into the transport of nanoparticles and the interfacial charge transfers on medium under electrical fields. The preliminary step in such an approach was first to develop a sample cell at the same time fit for optical and electrochemical measurement. The sample cell had also to be thinner than conventional sample cells previously developed by Cordouan for better optical accuracy. Once constructed, this sample cell was used to run experiments on a model of nanoparticles, the LudoxTMS0, composed of silicate nanoparticle in a saline aqueous solution. I did three different analyses: (i) optical characterization with a quantitative phase microscope, and electrochemical characterization with (ii) cyclic voltammetry experiment and (iii) electrical impedance spectroscopy. I combined experimental results with electric models like Randles circuit for modeling the reactions involved in electrolyte solutions, as well as the Debye-Hückel model to make the link between conductivity measurement and particles mobility. I managed to extract interesting information on the mobility of the nanoparticles in the range of electrophoretic potentials where surface charge transfers are negligible. These results allowed me to discuss about the observations made on Wallis measures and to guide the prototyping of a sample cell for the development of a new instrument.



Victor DESVEAUX

3A-Classique

CELLINK

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Itedale REDWAN**

Développement d'une bio-encre conductive.

CELLINK est l'entreprise leader mondial des fournisseurs pour la bio-impression. Dirigée par le Docteur Namro Redwan, l'équipe du Bio-Ink and Tissue Engineering a pour mission d'assurer la production des bioencres, mais aussi le développement de nouveaux protocoles pour la communauté scientifique, de bioencres ou modèles d'étude pertinents. Mon travail s'est principalement axé sur le développement d'une bioencre conductive, ainsi que de protocoles pour son impression. La première partie de mon travail a été l'écriture de protocole d'impression pour les encres produites à base de GelMA, et ceci pour les différentes imprimantes de CELLINK. La seconde partie à laquelle elle a été consacrée au développement de la bioencre conductive s'est principalement focalisée sur l'optimisation des concentrations des différents composants de la bioencre. L'objectif principal était d'atteindre une viabilité suffisante dans une encre conductive avec des cellules neurales progénitrices. Afin de réaliser ces études, l'investigation du comportement rhéologique de l'encre a été menée, la culture des cellules neurales a été réalisée durant la totalité de mon stage. Les bioimpressions ont été rendues possibles grâce aux imprimantes CELLINK, et la viabilité inspectée via un microscope à fluorescence. Cette nouvelle encre permettra l'élaboration de nouveaux modèles comprenant des tissus électriquement conductifs, comme des modèles d'implants cardiaques, des cellules musculaires et des réseaux neuraux.

Gothenburg • Suède

02/05/2018—28/09/2018



Development of a conductive bioink.

CELLINK is a company that is a world leading 3D Bioprinting technology provider. Led by Doctor Namro Redwan, the Bio-Ink and Tissue Engineering team have for main objectives; to produce bioinks; develop new protocols for the scientific community, develop new bioinks or relevant 3D tissue models. My work was focused on the development of a new conductive bioink, and relevant protocols for its application. The first part of my internship was to write printing protocols for GelMA based bioink using CELLINKS Bioprinters. Second, the conductive bioink development was focused on optimization of components of the bioink. The goal was to achieve a good viability in a conductive bioink with neural progenitor cells. To realize this study, investigation of rheological behavior of the bioink was performed, neural progenitor cells were cultured during the entire internship period. Bioprinting was performed using CELLINK bioprinters, and viability was evaluated using a fluorescence microscope. This new bioink will allow elaboration of new models including electrically conductive tissues, such as cardiac implants, muscle cells and neural networks.



Valentin DOUSSET

3A-Classique

CBMN

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Birgit HABENSTEIN**

Production et purification de protéines membranaires marquées isotopiquement pour leur étude par RMN du solide.

Durant ce stage j'ai pris part à deux projets de recherche portant sur deux protéines membranaires, impliquées respectivement dans la division cellulaire chez *Escherichia coli* et multiples processus essentiels chez *Bacillus subtilis*. Ces deux projets visent à caractériser la structure à l'échelle atomique de ces protéines ainsi que leur impact sur la fluidité membranaire lors de leur contact avec les membranes. Les membranes sont mimées par des liposomes qui sont des vésicules lipidiques contenant des bicouches lipidiques tels que les membranes cellulaires. La technique utilisée pour réaliser ces études est la RMN du solide qui nécessite l'utilisation d'échantillons isotopiquement marqués avec du ^{13}C , du ^{15}N du côté des protéines et du ^2H du côté des lipides.

Ce rapport de stage portera sur : (1) la production en milieu minimum isotopiquement marqué et la purification des échantillons des deux protéines utilisées pour étudier leur structure à l'échelle atomique par la RMN du carbone ^{13}C et de l'azote ^{15}N et (2) la production de ces protéines en milieu riche (non isotopiquement enrichi) afin d'étudier leurs effets sur la dynamique des membranes (marquées au deutérium) par RMN du deutérium (^2H). Pour cela, j'ai dans un premier temps, réalisé une transformation bactérienne afin d'insérer le plasmide permettant la surexpression de ces protéines chez *Escherichia coli*. Puis, j'ai suivi la culture des bactéries et induit la production des protéines d'intérêt avant de les extraire et de les purifier. Enfin, je les ai conditionnées dans un tampon compatible avec les analyses RMN et permettant leur repliement dans leur conformation native (et leur auto-assemblage dans le cas d'une des deux protéines).

PESSAC • France

07/05/2018 → 29/06/2018



During this internship I took part in two different research projects about two membrane-associated proteins, respectively involved in bacterial division in *Escherichia coli* and multiple cellular processes in *Bacillus subtilis*. These two projects aim at characterizing the structure at an atomic level of these two proteins and their impact on membrane fluidity when reconstituted in liposomes. Liposomes are lipidic vesicles that allow to mimic the lipid bilayer of a plasma membrane. The technic used to carry out these studies is the solid-state NMR that requires the use of isotopically labelled samples using ^{13}C , ^{15}N for the proteins and ^2H for the lipids.

This internship report will describe : (1) the production in minimum medium of isotopically labelled protein samples used to study both structures at the atomic level using carbon ^{13}C and nitrogen ^{15}N NMR and (2) the production of these proteins in a unlabelled rich media with the aim of studying their effect on membrane dynamics (labelled with deuterium) using deuterium (^2H) detected NMR. Firstly, I did the bacterial transformation to insert the plasmid required to overexpress these proteins in *Escherichia coli*. Then I followed the culture of bacteria and induced the production of the proteins of interest followed by their extraction and purification. Finally, I conditioned the proteins in a compatible buffer for NMR studies and to allow them to refold in their native conformation (and their auto-assembly in the case of one of the two proteins).



Elodie DROUET

3A-CPRO

NOVARTIS PHARMA SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Gareth SANDERSON**

Augmentation du rendement de l'étape de chromatographie d'adsorption en lit expansé pour le produit Simulect.

Le Simulect® est un médicament prescrit en prévention du rejet de greffe de rein. Son principe actif est un anticorps monoclonal produit par Novartis au sein de l'unité « Perfusion », sur le site de Huningue. Pour augmenter le rendement global de production, le sujet s'est notamment intéressé à la première étape de purification : la chromatographie d'adsorption en lit expansé ou EBA. Le rendement de l'étape peut être augmenté significativement par un chargement plus important, de la fraction récoltée en fin de culture cellulaire, sur la colonne. Cependant, la récolte en sortie du bioréacteur est riche en débris cellulaires et impuretés pouvant, s'ils sont trop nombreux, limiter l'efficacité de l'étape. Afin de limiter leur impact, le chargement s'arrête lorsqu'un volume maximal autorisé a été chargé ou lorsque la quantité en anticorps chargée atteint le seuil limite défini. Ces deux paramètres ont été étudiés de manière à augmenter le rendement de l'étape sans impact sur son efficacité ou sur les étapes suivantes, tout en restant en accord avec le dossier réglementaire. De plus, une étude statistique du rendement de l'étape a été réalisée afin de s'assurer que celui-ci ne serait pas impacté par l'un ou l'autre des changements envisagés.

HUNINGUE • France



Yield improvement on the expanded bed adsorption chromatography for Simulect.

Simulect® is a drug prescribed to prevent rejection in kidney transplants. Its active product is a monoclonal antibody produced by Novartis within the 'Perfusion' unit, in Huningue. To increase the production yield, the subject was focused on the first purification step: the expanded bed adsorption chromatography or EBA. Significant improvements can be achieved to load a higher amount of the fraction harvested at the end of the cell culture onto the column, and thus increase batch yield. However, the harvest out of the bioreactor is very concentrated in cell debris and impurities which could negatively impact the step efficiency if loaded in too high a quantity onto the column. In order to limit their impact, the load stops automatically whether the higher volume of solution allowed is reached or when the maximum quantity of antibodies loaded is equal to the allowed maximum. Those two parameters were studied in order to increase the yield of the EBA step without any impact either on the step efficiency or on the following steps while remaining within the regulatory file requirements. Moreover, a statistical analysis of the yield per step was performed to ensure the lack of impact coming from the first or the second change consider.



Maeva DUBOIS

3A-Classique

The Open University

Maître(s) de stage / Supervisor(s): David MALE

Ciblage du système nerveux central via des nanoparticules d'or.

De nos jours, 25 millions de personnes dans le monde sont atteintes par la maladie d'Alzheimer et 6,3 millions de personnes par la maladie de Parkinson. Jusqu'à présent, le traitement de la plupart des maladies neurodégénératives était impossible en raison d'une structure cellulaire spécifique : la barrière hématoencéphalique ; empêchant l'entrée de la plupart des agents thérapeutiques au sein du cerveau. Le mouvement des molécules au sein du cerveau est restreint par des jonctions serrées connectant les cellules endothéliales du cerveau pour en assurer sa protection. Ainsi, cibler spécifiquement le système nerveux central (SNC) pour transporter des médicaments au sein du cerveau serait une avancée majeure dans la recherche consacrée aux maladies neurodégénératives.

La délivrance d'agents thérapeutiques au sein du SNC implique l'utilisation de nanoparticules (NPs) d'or de 5nm en tant que transporteurs. La stratégie consiste en la liaison de ces NPs d'or avec des ligands spécifiques correspondant à des peptides ciblant le récepteur à la transferrine. Plusieurs peptides potentiels sont capables d'interagir spécifiquement avec le récepteur à la transferrine qui est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales du cerveau, en comparaison avec d'autres types d'endothélium. Par conséquent, les cellules endothéliales du cerveau internaliseront les NPs d'or après liaison des peptides sur le récepteur à la transferrine via endocytose médiée par ce récepteur.

Le but de ce projet était dans un premier temps de déterminer quel peptide serait le meilleur à se lier au récepteur à la transferrine exprimé à la surface d'une lignée cellulaire d'endothélium de cerveau in-vitro (hCMEC/D3). L'absorption pour chaque peptide a été détectée par cytométrie de flux. Puis l'absorption de NPs d'or recouvertes de différents ratios de peptides a également été déterminée via microscopie à transmission électronique (MET) dans des cellules endothéliales du cerveau (hCMEC/D3). Enfin, l'effet du sérum sur les NPs d'or a été testé par gel d'électrophorèse afin d'investiguer le comportement des NPs en présence de sérum après injection in-vivo de NPs.



Maurine FLEURY

3A-Classique

INSERM UMR 892

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Julien BARC

Caractérisation fonctionnelle de variants rares et fréquents localisés dans des régions non-codantes du génome et associés à des pathologies à risque de mort subite cardiaque.

Les recherches menées par le groupe de Julien Barc, au sein de l'équipe de génétique cardiovasculaire de l'Institut du thorax, sont orientées sur l'identification et la caractérisation de marqueurs de prédispositions génétiques pour les maladies électriques cardiaques rares induisant des arythmies à risque de mort subite. Mon travail au cours de ce stage a porté sur deux projets dont les objectifs étaient de caractériser les conséquences fonctionnelles de variants génétiques (rares et fréquents) situés dans des régions non codantes du génome. Le premier projet a consisté à étudier l'impact d'une mutation hétérozygote située dans un site donneur d'épissage d'un gène codant pour un échangeur ionique cardiaque et à l'origine d'une forme familiale de syndrome du QT court (SQTC). L'allèle non-muté et muté d'un patient de la famille ont été clonés dans un vecteur puis transfectés et testés in vitro. Par ailleurs, j'ai recherché in situ l'existence de transcrit affecté par cette mutation dans les cellules provenant du patient. Les résultats montrent l'impact de ce variant rare sur l'épissage alternatif ainsi que sur le transcrit de cet échangeur et son implication dans le SQTC retrouvé dans cette famille. Le second projet a porté sur le développement d'une méthode de caractérisation du rôle des régions non-codantes du génome, siège de la régulation des gènes (promoteurs, enhancers, sites de fixation de facteurs de transcription) et en particulier dans le contexte de pathologies cardiaques humaines. Pour cela, des bibliothèques d'ADN ont été générées par la méthode d'ATAC-seq à partir de cardiomyocytes humains dérivés de cellules hiPSC de patients atteints du syndrome de Brugada (SBr) et de contrôles. Les premiers résultats générés par séquençage nouvelle génération (NGS) des bibliothèques ont permis de cartographier les régions ouvertes et actives du génome dans les cardiomyocytes et d'identifier les régions impactées par des variants fréquents associés au SBr.

MILTON KEYNES • Royaume-Uni

16/05/2018—14/09/2018



Targeting gold nanoparticles to the central nervous system.

Nowadays, 25 million people in the world are affected by Alzheimer's disease and 6.3 million by Parkinson's disease. So far, therapy of most neurodegenerative diseases has been impossible due to a specific cellular structure: the blood brain barrier (BBB), which prevents the entry of most therapeutic agents into the brain. Molecular movement through the BBB is restricted by tight junctions connecting brain endothelial cells which protects the brain. Thus, targeting specifically the central nervous system (CNS) to deliver drugs through the brain would be a major breakthrough in neurodegenerative disease research.

Delivery of therapeutic agents to the CNS involves the use of 5 nm gold nanoparticles (NPs) as carriers. The strategy involves binding of these gold NPs to specific ligands including transferrin receptor (Tfr)-targeting peptides. Several potential Tfr-targeting peptides are able to interact specifically with the transferrin receptor which is highly expressed on brain endothelial cells, in comparison with other endothelium types. Consequently, brain endothelial cells will internalize these gold NPs after the binding of peptides onto the Tfr by receptor-mediated endocytosis.

The aim of this project was to determine which peptides would be the best to bind the transferrin receptor expressed at the surface of an in-vitro brain endothelial cell line (hCMEC/D3) firstly. The uptake of all peptides has been detected by flow cytometry. The uptake of gold NPs coated with various peptide ratios into hCMEC/D3 cells has been determined by transmission electron microscopy afterwards. Finally, the effect of serum on gold NPs has been assessed by gel electrophoresis in order to investigate how NPs behave in serum following in-vivo NPs injection.

NANTES • France

22/05/2018—28/09/2018

Inserm



Functional characterisation of rare and frequent variants located in non-coding regions of the genome associated with diseases with a high risk of sudden cardiac death.

The research conducted by the group of Julien Barc, within the cardiovascular genetic team of the Institut du thorax is focused on identification and characterisation of genetic markers of predisposition in cardiac electrical diseases leading to arrhythmia and sudden cardiac death. The aim of my internship projects was to characterize functional consequences of genetic variants (both rare and frequent) located in non-coding regions of the genome. The first project was to study the impact of a heterozygous mutation located in a splice donor site of a gene encoding for a cardiac channel exchanger and involved in the short QT syndrome family (SQTS). The WT and mutant allele of the patient were cloned into a plasmid and then transfected and tested in-vitro. I have also looked for RNA sequence abnormalities induced by this mutation in the leucocytes of the patient. The results show the impact of the mutation on the alternative splicing and on the RNA sequence of the cardiac exchanger in the SQTS. The aim of the second project was to develop a method to characterize the function of non-coding regions (promoters, enhancers, binding sites of transcription factors) especially in human cardiac diseases. To this purpose, DNA library coming from the culture of cardiomyocytes derived from hiPSC of patients with Brugada syndrome (SBr) and controls were generated with the ATAC-seq method. The first results obtained by next-generation sequencing (NGS) show opened and activated genomic regions of the cardiomyocytes and also the regulatory regions impacted by frequent variants previously associated with SBr.



Estelle FORT

3A-Classique

CILOA

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Robert MAMOUN**

Mise au point d'un test AlphaLISA adapté au modèle des exosomes.

L'entreprise Ciloa se dédie à la production de protéines membranaires dans leur structure native à la surface des exosomes grâce au signal d'adressage délivré par le peptide pilote breveté par la société. Cette technologie est utilisée au sein de la société dans le but d'explorer trois axes : le développement d'anticorps thérapeutiques efficaces contre des cibles difficiles d'accès, le développement de vaccins sans virus ni adjuvants et le développement de vecteurs thérapeutiques sans virus. Le projet sur lequel j'ai travaillé durant mon stage s'inscrit dans le premier axe : les protéines membranaires en surface des exosomes constituent des antigènes capables de déclencher des réponses immunitaires spécifiques et sont utilisées pour créer des anticorps thérapeutiques. A l'issue de l'obtention de ces anticorps, il est nécessaire d'effectuer un criblage pour identifier ceux qui sont spécifiques de la protéine membranaire d'intérêt. Pour cela, un test ELISA peut être réalisé, mais cette technique est difficile à robotiser et nécessite du temps en raison des nombreux lavages à effectuer et des divers temps d'incubation. L'objectif de mon stage à Ciloa a été de développer un test AlphaLISA dans le but de cribler des anticorps spécifiques de deux cibles membranaires de type RCPG présentes à la surface des exosomes, sans lavages donc plus rapidement et de manière plus sensible et automatisable à terme. Le principe de l'AlphaLISA repose sur le rapprochement de deux billes par l'interaction entre deux molécules. Une bille donneuse liée à l'une des deux molécules, sous excitation à 680 nm, émet un singulet d'oxygène. Une bille acceptrice liée à l'autre molécule, émet une lumière à 615 nm dès la réception du singulet. Nous avons mis en place un système dans lequel la bille donneuse accroche un exosome biotinylé porteur d'une protéine membranaire cible. La bille acceptrice permet d'accrocher l'anticorps dont on veut tester l'interaction avec la cible présente à la surface de l'exosome. Nous avons obtenu des résultats qui permettent d'identifier des interactions spécifiques entre anticorps et protéines membranaires cibles de type RCPG.

MONTPELLIER • France

02/05/2018 → 29/09/2018



The Ciloa company is dedicated to the production of membrane proteins in their native conformation on exosomes thanks to the pilot peptide. This technology is used through three application fields : therapeutic antibodies against undruggable targets, vaccines without viruses or adjuvants and therapeutic vectors without viruses. The project I worked on during my internship focuses on the first axis : membrane proteins on exosomes are able to trigger specific immune responses and can be used to develop therapeutic antibodies. After obtaining these antibodies, it is necessary to select and characterize monoclonal antibodies which are specific to the targeted membrane protein. An ELISA can be performed, but this technique needs time and it is difficult to automate because of the many washes and the various incubation times. Consequently, the purpose of my project was to convert an ELISA to an AlphaLISA immunoassay in order to screen antibodies developed against two membrane GPCRs targets on the surface of exosomes in a faster, more sensitive and automatable way. The principle of the AlphaLISA technology is based on the fact that two beads come into close proximity thanks to the interaction between two molecules : a donor bead bound to one of the two molecules is excited at 680 nm and releases a singlet oxygen. An acceptor bead, bound to the other molecule, emits light at 615 nm after receiving the singlet. Thus, in order to adapt this technology to our model and to optimize it, we have set up a system in which the donor bead binds to a biotinylated exosome carrying a target membrane protein on its surface. The acceptor bead is directly conjugated to an antibody which is able to recognize the antibody we want to screen, specific to the targeted membrane protein on the exosome. We have obtained results which allow us to identify specific interactions between antibodies and their membrane protein targets of GPCR type.



Nolwenn FOSSIER

3A-CBI

ABCHECK

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Yuriy RZHEPETSYY**

Développement d'une sonde fluorescente pour la détection de l'activation d'un RCPG.

AbCheck est une entreprise de biotechnologie qui découvre et optimise des anticorps thérapeutiques humanisés sur la base de multiples plateformes technologiques propriétaires. L'entreprise possède, de plus, un département de développement des nouvelles technologies travaillant sur le développement d'essais pour la sélection d'anticorps agissant sur les RCPGs. En effet, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de molécules de surface cellulaire impliquées dans la transmission de signaux. Ces récepteurs contrôlent les fonctions physiologiques clés et apparaissent comme les acteurs essentiels de nombreuses maladies, notamment les cancers. Etant donné leur rôle majeur dans certaines pathologies, les RCPGs représentent actuellement la plus grande famille de cibles thérapeutiques. Le développement de test permettant de sélectionner les ligands aux RCPG demeure la priorité majeure de la recherche mondiale. Une des approches possibles repose sur la mesure de la concentration cellulaire en cAMP grâce à une sonde fluorescente cytoplasmique. Récemment, de nombreuses sondes fluorescentes utilisant le domaine de liaison au cAMP de la protéine Epac pour produire un signal basé sur l'effet FRET ont été développées. Le récepteur GPCR modèle ADRB3 a été choisi pour démontrer le procédé.

Au cours de mon stage, j'ai travaillé sur l'établissement de l'essai, c'est-à-dire sur le développement du protocole des expériences de FRET et sur la création d'une lignée cellulaire HEK293 stable exprimant la sonde cAMP et le récepteur ADRB3. Dans ce but, j'ai démontré que la sonde CFP-Epac-YFP répond rapidement aux changements de la concentration intracellulaire en cAMP. J'ai aussi prouvé que le signal FRET observé est spécifique du récepteur RCPG testé. La concentration optimale de l'agoniste chimique spécifique du récepteur a été déterminée. De plus, j'ai réalisé de nombreux clonages de vecteurs recombinants. J'ai en particulier construit un vecteur bicistronique contenant les gènes d'ADRB3 et de la sonde fluorescente sous différents promoteurs dans le but d'établir une lignée stable HEK293-ADRB3-sonde cAMP. En résumé, le protocole que j'ai développé pourra potentiellement être utilisé pour la sélection d'anticorps anti-RCPG avec une fonction agoniste.

PLZEN • République tchèque

01/06/2018 → 31/10/2018



Development of a fluorescent sensor for detection of GPCR activation

AbCheck is a biotechnology company which discovers and optimizes human therapeutic antibodies based on multiple versatile proprietary technology platforms. The company also have a New Technology Development department working on development of efficient assays for screening for antibodies able to act on GPCRs. G-protein-coupled-receptors (GPCRs) represent the largest family of cell-surface molecules involved in signal transmission. These receptors control key physiological functions and emerged as crucial players in various diseases, particularly in cancers. Given their importance in health and disease, GPCRs represent the largest family of druggable targets. GPCR assay development and GPCR ligand screening remain the major focus of drug discovery research worldwide. One of the approaches to develop such assay is measuring cellular levels of cAMP using cytoplasmic fluorescent probe. Recently, a number of new fluorescent probes were developed where the cAMP binding domain of Epac protein was used which produce FRET-based signal. A model GPCR receptor, ADRB3 was chosen to demonstrate proof of principle of the process.

I was working on establishing the functional assay which included developing the FRET experiment protocol and creating the stable HEK293 cell line expressing cAMP sensor and ADRB3 receptor. In order to do this, I demonstrated that the protein sensor of CFP-Epac-YFP can quickly respond to intracellular levels of cAMP. I also proved that the FRET response was specific to the GPCR receptor we tested and found optimal concentration of specific chemical GPCR agonist. In addition, I had performed numerous recombinant vector cloning, in particular to construct a bicistronic vector carrying ADRB3 and cAMP sensor gene under different promoter in order to establish HEK293-ADRB3-cAMP sensor stable lines. In summary, the protocol which I developed potentially can be used to screen for anti-GPCR antibodies with agonistic function.



Simon GAUDIN

3A-CBI

IFREMER

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Francis MAIRET**

Influence des conditions de culture sur l'allocation de l'azote chez la micro-algue *Tisochrysis lutea*

La recherche au laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues dans lequel j'ai effectué mon stage est orientée sur la compréhension de la physiologie des micro-algues.

Les micro-algues sont des organismes intéressants du point de vue environnemental, mais aussi sur des thématiques plus appliquées. En effet, de nombreuses recherches sont menées dans le cadre d'application industrielle dans le domaine de l'énergie, de l'agroalimentaire ou de l'environnement. Une bonne compréhension des voies métaboliques et de l'organisation de ces cellules est essentielle pour mener des travaux innovants. Une des préoccupations du laboratoire PBA, qui fait l'objet de mon stage est d'identifier clairement les caractéristiques de l'allocation de l'azote d'une souche modèle: *Tisochrysis lutea* (utilisée notamment en aquaculture) selon les conditions de culture.

Au cours de ce stage, j'ai dû identifier les molécules azotées majoritaires à étudier pour avoir un aperçu global de l'allocation de l'azote chez la micro-algue modèle. Ainsi, je me suis consacré à l'étude des réserves intracellulaires d'azote inorganique, des protéines et acides nucléiques, des acides aminés libres et de l'azote total. Pour ce faire, il a été nécessaire d'élaborer ou d'optimiser des protocoles d'extraction et de dosage, en prenant en compte les ressources et le savoir-faire du laboratoire.

Deux cultures semi-continues de 3 à 4 semaines ont ensuite été menées, l'une avec un éclairage continu, l'autre plus proche de la réalité avec un cycle jour/nuit. Dans chaque cas, des carences en azote ont été réalisées. Dans des conditions de culture non limitées en azote, nous avons pu observer des variations diurnes importantes de la répartition de l'azote dans les différents pools. La carence modifie profondément la répartition de l'azote cellulaire et les variations sont largement atténuées.

La suite de mes travaux sera essentiellement analytique pour révéler des caractéristiques physiologiques intéressantes de la micro-algue cultivée, avec notamment la vérification du bilan total de l'azote intracellulaire entre les différents pools, la comparaison entre les états physiologiques, et la discussion des résultats.

NANTES • France

04/06/2018—31/10/2018



The effects of culture conditions on the nitrogen allocation in the micro-algae *Tisochrysis lutea*

The research at the algae physiology and biotechnology laboratory (PBA) in which I did my internship is focused on the understanding of micro-algae physiology.

Micro-algae are interesting organisms from an environmental point of view, but also on more applied themes. Indeed, many researches are carried out within the framework of industrial application in the field of energy, agribusiness or the environment. A good understanding of the metabolic pathways and organization of these cells is essential for conducting innovative work. One of the concerns of the PBA laboratory, which is the subject of my internship, is the comprehension of nitrogen allocation according to different culture conditions, especially for a model strain: *Tisochrysis lutea* (commonly used in fish farming).

During this internship, I identified the major nitrogenous molecules to study, to obtain a nitrogen allocation preview in this micro-algae. Thus, I dedicated my work on the analysis of intracellular inorganic nitrogen, proteins, nucleic acids, free amino acids, and total nitrogen content. To do this, it was necessary to create, and optimize extraction and dosage protocols, taking into account the means and the skills in the laboratory.

Two semi-continuous cultures were carried out during 3 to 4 weeks, one with continuous lighting and the other with day/night cycles. Each experiment includes a period of nitrogen deprivation. We observed important diurnal variation of nitrogen repartition. These variations dropped while cultures are nitrogen deficient.

The rest of my work will be mostly analytical in order to identify interesting physiological characteristics of the cultured micro-algae, especially by checking the total nitrogen balance, and studying the variations of all the nitrogen pools between the physiological states.



Alexandre GOUX

3A-Classique

BIOVERSYS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Vincent TREBOSC**

Caractérisation d'un régulateur transcriptionnel comme cible thérapeutique potentielle afin de bloquer les mécanismes de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Depuis leur découverte en 1928, les antibiotiques ont permis le développement de la médecine moderne et sauvé des millions de vies. Cependant, un usage excessif et négligé a permis à de nombreuses bactéries d'acquiescer des résistances et de redevenir une menace sérieuse pour la santé humaine. Les pathogènes de type Gram-négatifs tels que *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont particulièrement difficiles à traiter lors d'infections chez les patients hospitalisés. Bioversys AG a identifié un régulateur transcriptionnel (RT) essentiel pour la virulence de *E. coli* et *A. baumannii*. Des molécules inhibant spécifiquement ce RT sont actuellement en cours de développement à Bioversys afin de trouver un traitement contre la virulence de ces pathogènes. Mon rôle au cours de ce stage a été d'étudier le rôle de ce RT dans *P. aeruginosa*. Pour mener à bien ce projet, j'ai dans un premier temps construit un mutant délété pour le gène codant pour ce RT ainsi qu'une souche complémentée qui exprime de nouveau le RT via un plasmide. J'ai ensuite caractérisé les souches par l'intermédiaire de différentes expériences. J'ai étudié la virulence en utilisant comme modèle les larves du papillon de nuit *Galleria mellonella* et évalué la résistance aux antibiotiques en mesurant les concentrations minimales inhibitrices. J'ai également caractérisé d'autres aspects phénotypiques tels que la capacité à pousser à différents pH ainsi que la production de pigments impliqués dans la virulence. Enfin, le niveau d'expression de gènes régulés par le RT a été évalué dans le but d'identifier des marqueurs potentiels de son inhibition. Ces marqueurs permettront à l'équipe de déterminer la capacité d'un composé à inhiber spécifiquement ce RT chez *P. aeruginosa*.

Basel • Suisse

07/05/2018—21/09/2018



Characterization of the role of a specific transcriptional regulator as a potential anti-virulence drug target against *Pseudomonas aeruginosa*.

Since 1928 and their discovery, antibiotics have enabled modern medicine and saved millions of lives. However, negligence and overuse allowed numerous bacteria to acquire resistances and to become again a serious threat. Gram-negative pathogens, such as *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, are causing serious and difficult issues to treat infections in hospitalized patients. Bioversys AG has identified a specific transcriptional regulator (TR), which is essential for the virulence of *E. coli* and *A. baumannii*. Anti-virulence drugs inhibiting this specific TR are currently in development at BioVersys. My role during this internship was to study the role of this specific TR in *P. aeruginosa*. To achieve this goal, I have first constructed a knock-out mutant of the gene coding for the TR together with a plasmid mediated complementation strain. Then I have characterized the strains in different assays. I have studied the virulence of the strains in a wax moth larvae model (*Galleria mellonella*) and evaluated their antibiotic resistances by measuring the minimal inhibitory concentration for several antibiotics. I have also characterized other phenotypes, such as the capacity to grow at different pH and to produce pigments involved in virulence. Finally, the expression level of genes regulated by the TR was evaluated in order to identify potential markers of inhibition. These markers may allow the team to determine the capacity of a compound to inhibit this specific TR in *P. aeruginosa*.



Océane GUYOT

3A-Classique

FLUOFARMA

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Florian SIMON**

Développement d'un panel de tests d'efficacité anti-pollution in vitro pour l'industrie cosmétique.

Avec 54% de la population mondiale vivant dans des zones urbaines, le nombre de personnes exposées à la pollution ne cesse de croître. De plus, la pollution est devenue perceptible dans beaucoup de grandes villes avec près de 80% des zones urbaines présentant des niveaux de polluants supérieurs aux niveaux recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé. En contact direct avec son environnement extérieur, la peau se trouve extrêmement exposée à la pollution et ne dispose pas des moyens nécessaires pour la neutraliser. Par conséquent, la mise au point de tests d'efficacité anti-pollution est un enjeu majeur pour l'industrie cosmétique. Une exposition répétée favorise un état inflammatoire et un vieillissement prématuré des kératinocytes de l'épiderme qui constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Les polluants agissent sur les cellules exposées selon quatre mécanismes biologiques : la dégénérescence cellulaire, la génération de radicaux libres, l'induction de cascades inflammatoires mais aussi l'activation des voies des récepteurs des hydrocarbures aromatiques et Nrf2. Pour aborder ces mécanismes, un panel de tests d'efficacité in vitro a été développé sur une lignée cellulaire et des cultures primaires de kératinocytes adultes humains. Ces cellules ont été exposées à des poussières directement collectées en zone urbaine qui en font un polluant de choix. Le test de composés protecteurs contre les dommages oxydatifs causés par les poussières urbaines a été réalisé par des mesures des espèces réactives de l'oxygène et de la peroxydation lipidique au niveau cellulaire en cytométrie en flux. Les effets anti-inflammatoires des ingrédients ont également été évalués en parallèle en mesurant la libération de cytokines dans le milieu de croissance. Outre l'induction de radicaux libres et de l'inflammation, les poussières urbaines engendrent une dégénérescence des kératinocytes à travers la voie autophagique et le potentiel mitochondrial. Ainsi, en étudiant ces différents phénomènes biologiques induits après une exposition à la pollution, des centaines d'ingrédients cosmétiques pourraient être testés pour leurs propriétés protectrices contre les polluants.

PESSAC • France

02/05/2018 → 14/09/2018

FLUOFARMA®



Development of an in vitro panel anti-pollution efficiency tests for cosmetics industry.

With 54% of the world population living in urban areas, the number of people exposed to pollutants is still increasing. Moreover, pollution has become perceptible in many cities. Almost 80% of urban areas have a level of pollutants greater than the recommended levels of the World Health Organization. Directly in contact with its external environment, the skin is extremely exposed to pollution and doesn't have necessary means to neutralize it. Therefore, the development of anti-pollution efficacy tests has sped to the top of the cosmetics industry's agenda. Repeated exposure induce an inflammatory stress and a premature ageing of epidermal keratinocytes, which are in first line against external assaults. Pollutants act on exposed cells through four biological mechanisms: cellular degeneration, free radicals generation, inflammatory cascades induction and aryl hydrocarbon receptor / Nrf2 pathways activation. To address these mechanisms, a panel of in vitro efficacy tests has been developed on a cell line and on primary human adult keratinocytes cultures. These cells have been exposed to dust directly collected in urban areas, which makes them an excellent choice as pollutant (urban dust). The protection against oxidative damage caused by urban dust was performed by measurements of reactive oxygen species and lipid peroxidation at the cellular level by flow cytometry. In parallel, anti-inflammatory effects of ingredients were also assessed by measuring cytokines release in growth medium. In addition to free radicals and inflammation inductions, urban dust triggered keratinocytes degeneration through the autophagic pathway and mitochondrial membrane potential decrease. Thus, designing assays to study these different biological phenomena induced after a pollution exposure allow Fluofarma to test hundreds of cosmetic ingredients for their protective properties against pollutants.



Salomé HERBIN

3A-CBI

Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Denny POPP**

Effet du graphite comme matériau conducteur sur la production de méthane durant la digestion anaérobie.

Les énergies renouvelables sont un secteur en expansion. Au sein de cette branche, la biomasse constitue une ressource actuelle et répandue pour la production de biogaz. Utilisant les microorganismes pour la digestion anaérobie (DA) de la matière organique, elle permet la production de méthane et pour ensuite générer de l'électricité, de la chaleur ou du carburant. Ce processus implique une grande variété de micro-organismes, coopérant de manière syntrophique. Une étape clé de la DA appelée acétogénèse, repose sur la dégradation d'acétate par les bactéries acétogènes, les produits de la réaction servant de substrat aux archées méthanogènes. Ce processus comprends un Transfert d'Électrons Inter-espèce (TEI), où les électrons, transportés par l'hydrogène ou le formate, vont des bactéries acétogènes aux archées méthanogènes. Récemment, des études ont montré que le TEI pouvait être amélioré en supplémentant le milieu de culture avec des matériaux conducteurs. Ce processus alors appelé Transfert Direct d'Électrons Inter-espèce (TDEI), augmenterait la dégradation des acides gras. Dans ce contexte, mon stage portait sur l'étude de l'effet du graphite comme matériau conducteur pour améliorer la production de méthane. Deux types d'inoculum ont été expérimentés, avec l'acide propionique comme source de carbone. Différentes quantités de graphite ont été testées, avec différents volumes de culture. Plusieurs techniques ont été utilisées pour suivre la dégradation de propionate et la production de biogaz : par suivi de la pression au cours de cycle fed batch de 48h, chromatographie en phase gazeuse et mesures CLHP. Il en a résulté une plus grande production de méthane quand les cultures étaient supplémentées avec du graphite, malgré un potentiel effet inhibiteur dû à une acidification et une accumulation du substrat.

LEIPZIG • Allemagne

15/06/2018 → 14/09/2018



Effect of the conductive material graphite on methane production during anaerobic digestion.

Renewable energy is an expanding sector. In this field, biomass is a current and widespread source of biogas production. Using microorganisms for anaerobic digestion (AD) of organic matter, it leads to methane production for electricity, heat or fuel provision. This process involves a large variety of microorganisms which cooperate syntrophically. A key-step of AD called acetogenesis, consists of acetate degradation by acetogenic bacteria into products which are the substrate for methanogens. The process implies Interspecies Electron Transfer (IET), where electrons, carried by hydrogen or formate, go from acetogenic bacteria to methanogens. Recently, studies have shown that IET could be improved by supplementing culture with conductive materials. In this way, this new process called Direct Interspecies Electron Transfer (DIET) could enhance fatty acid degradation. In this context, my investigation was about studying effect of graphite as a conductive material to enhance methane production, with two types of inocula, using propionate as carbon source. Different amounts of graphite were tested, in different volume of culture. Different techniques were used to monitor propionate degradation and biogas production, by following pressure along 48 hours fed batch cycles, gas chromatography and HPLC sampling. Finally, a better methane production has been found when cultures were supplemented with graphite, despite of a potential inhibitor effect generated by acidification and substrate accumulation.



Perrine LATRILLE

3A-Classique

National University of Ireland Galway

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Timothy O'BRIEN

Création de films d'oxyde de graphène et caractérisation de ses propriétés antibactériennes et angiogéniques.

Le graphène est un matériau qui présente des propriétés exceptionnelles du fait de sa structure en deux dimensions. La communauté scientifique porte un intérêt croissant pour ce matériau prometteur dans l'espoir de voir émerger des innovations dans le domaine médical notamment. Le graphène a récemment montré des propriétés angiogéniques essentielles aux processus de réparation osseuse, ou encore de cicatrisation des plaies. Bien que son avenir soit prometteur, le prix exorbitant de production du graphène ainsi que son manque de stabilité en milieu aqueux sont des obstacles à son utilisation en médecine régénérative. Le graphène oxydé, moins cher à produire, présente aussi une bonne stabilité in vitro.

A l'institut de médecine régénérative de Galway (REMEDI), le programme de recherche orthopédique vise à la découverte de technologies peu invasives qui, en synergie avec des cellules souches, permettraient d'améliorer l'utilisation d'implants médicaux. La lutte contre la résistance aux antibiotiques, ainsi qu'une action bénéfique sur la réparation osseuse sont des objectifs qui pourraient être atteints avec l'utilisation de revêtement graphène oxydé sur des implants.

Dans ce contexte, mon projet a deux objectifs majeurs. Premièrement, la création de films de graphène oxydé de façon plus simple et économique. Et deuxièmement, l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes et angiogéniques au cours d'expériences in vitro.

Pour ce faire, différents films de graphène oxydé ont été générés puis leurs topographies étudiées par microscopie à force atomique (AFM). Dans un second temps, les films ont été mis en contact avec des cellules souches endothéliales pour l'observation de leurs propriétés angiogéniques. Finalement, leur capacité à inhiber la formation de biofilms a été évaluée sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline.

Galway • Irlande

03/05/2018 → 07/09/2018



NUI Galway
O'É Gaillimh



Generation of graphene oxide sheets and characterization of its antibacterial and angiogenic properties.

Graphene materials exhibit superior properties due to unique 2D structure. There are significant interests in the scientific community to use these materials for innovative medical applications. Graphene materials recently showed angiogenic properties which are essential in bone fracture repair or wound healing. Despite such strong promise, the high cost of production and the lack of stability in wet environment hindered its use in valuable applications such as in regenerative medicine. Modified graphene oxide materials demonstrated good stability in vitro and a relatively low cost of production.

At the Regenerative Medicine Institute (REMEDI), the orthopaedics research programme searches for minimally invasive technologies to work in synergy with stem cells to advance the applications of medical implants. The fight against antibiotic resistance in addition to better integration with bone, is an objective that could be reached using modified graphene oxide coatings or sheets. The need to bypass the use of antibiotics is more important than ever before.

In this context, my project has two major aims. Firstly, the generation of graphene oxide sheets in an easier and economical way. Secondly, the assessment of their potential antibacterial and angiogenic properties through a number of in vitro assays.

With this aim in mind, variant graphene oxide sheets were generated while their topography was studied using atomic force microscopy. Then, the sheets were put in contact with endothelial stem cells for the study of their angiogenic properties. Finally, their ability to inhibit biofilm formation was assessed on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.



Maxime LAURET

3A-CPRO

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Raphaël DRION

Mise en place de procédures pour la vérification du package de colonnes de chromatographie .

GSK vaccines est une filiale de GlaxoSmithKline spécialisée dans la production, la formulation et la distribution de vaccins à travers le monde. Son portefeuille comprend 41 vaccins permettant une protection contre 22 maladies différentes. L'équipe Malaria, du site de Rixensart en Belgique, produit le vaccin Mosquirix contre le paludisme d'Afrique. Sa production peut-être décomposée en deux grandes étapes. Dans un premier temps, la protéine d'intérêt est produite par des levures génétiquement modifiées puis, dans un second temps, celle-ci est purifiée. Cette étape de purification permet de séparer la molécule des levures ainsi que du milieu de culture. Différentes techniques sont utilisées pour purifier la protéine d'intérêt. Mon travail au cours de ce stage concernait les chromatographies sur colonne. Il existe différents types de chromatographie mais le principe est similaire : une phase mobile contenant la protéine d'intérêt traverse une phase stationnaire constituée de billes. Les propriétés intrinsèques de la molécule, telles sa charge, sa taille ou encore son hydrophobicité permettent de l'isoler des autres éléments. L'homogénéité de la phase stationnaire est primordiale pour assurer une bonne séparation des composés. Cette homogénéité dépend en grande partie de la qualité du package de la colonne réalisé par un opérateur. Il est alors nécessaire de contrôler la qualité du package, le nombre de plateaux théoriques permet de l'évaluer. Différentes méthodes existent pour réaliser cette mesure, l'objectif de ce stage était de mettre en place la méthode la plus adaptée pour chacune des chromatographies du procédé de purification du bulk du vaccin Malaria.

Rixensart • Belgique

01/06/2018 → 01/10/2018



Mise en place de procédures pour la vérification du package de colonnes de chromatographie

GSK vaccines is a GlaxoSmithKline subsidiary specialized in the production, the formulation and the distribution of vaccines across the world. Its portfolio contains 41 vaccines allowing a protection against 22 different diseases. The Malaria team, from Rixensart site in Belgium, produces the Mosquirix vaccine against the African Malaria. Its production can be separated in two major phases. Firstly, the protein of interest is produced by genetically modified yeasts, secondly, this protein is purified. This phase of purification permit to separate the molecule from the yeasts and the cell culture media. Different techniques are used in order to purify the protein of interest. During this internship I focused my work on the column chromatographies. Different chromatographies can be used but the principle remains the same : a mobile phase which contains the protein of interest passes through a stationary phase made from beads. The intrinsic properties of the molecule, such as its electrical charge, its size or its hydrophobicity allow to isolate it from the other components. The homogeneity of the stationary phase is important for a good separation. It largely depends of the packing quality. It becomes necessary to control the packing quality, the number of theoretical plates allows to evaluate it. Different methods exist to make this measurement, the objective of this internship was to settle the best method for each chromatography of the purification process of the Malaria vaccine bulk.



Vincent LOUVEL

3A-CPRO

INNOBIOCHIPS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Virginie LEFEVRE**

Caractérisation analytique d'une méthode de diagnostic multiplexe: HISTO SPOT® HLA AB.

En 2017, d'après l'agence de la biomédecine 6105 personnes ont bénéficié d'une greffe d'organes en France pour 23 828 patients inscrits sur liste d'attente. Avant de transplanter un patient il est nécessaire de s'assurer de la compatibilité du couple donneur/receveur. Chaque individu possède un patrimoine unique de marqueurs moléculaires, les protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH ou HLA pour « Human Leucocyte Antigen »), régissant la reconnaissance du soi et du non soi. Ces protéines sont fortement immunogènes et par conséquent fortement impliquées dans le risque de rejet lors des transplantations d'organes. Après la greffe, l'apparition dans le sang d'anticorps dirigés contre les molécules HLA du donneur peut être un signe de rejet de greffe. L'agence de la biomédecine a mis en place un suivi de ces anticorps avant et après la greffe mettant en œuvre des techniques d'identification des anticorps anti-HLA.

Innobiochips, entreprise créée en 2008, est spécialisée dans la conception d'outils d'immuno-diagnostic multiplexe : les biopuces. Cette technologie consiste en l'adsorption de biomolécules (peptides, protéines ou même cellules) sur une surface fonctionnalisée selon un procédé breveté par Innobiochips. L'entreprise a développé et commercialise depuis 2016 un kit, HISTO SPOT HLA AB® qui permet la recherche et l'identification haute résolution des anticorps anti-HLA dans le sérum de patients. Les profils anticorps obtenus avec ce kit montrent des niveaux de concordances variables en fonction des échantillons par rapport à ceux obtenus avec un autre test plus couramment utilisé aujourd'hui. L'objectif du stage est de valider la cohérence des résultats obtenus sur les biopuces en étudiant l'impact de la qualité des antigènes sur les performances du kit. Ce travail devrait permettre à Innobiochips d'améliorer les méthodes de contrôle du produit dans le but de proposer aux patients en attente de greffe ou déjà greffés de disposer d'un diagnostic plus fiable.

LOOS • France

14/05/2018→28/09/2018

Understanding life.
innobiochips



Analytical characterization of a multiplex diagnostic method : HISTO SPOT HLA AB®

According to the biomedicine agency, 6105 persons have been transplanted in France in 2017 for a total amount of 23 828 transplant waiters. Before transplanting an organ, it is necessary to make sure of the compatibility of both organ donor and recipient. Each person owns a specific heritage of molecular markers: the proteins of the HLA (for "Human Leucocyte Antigens"), which drives the self-recognition. Those protein are highly immunogenic hence their importance in organ transplantations. The appearance of anti-HLA antibodies against the organ donor after a transplant is a sign of a transplant reject. The biomedicine agency has written a protocol for the anti-HLA antibodies monitoring before and after an organ transplant with the use of identification methods of anti-HLA antibodies.

Innobiochips, a company created in 2008, is specialized in the conception of multiplex immuno-diagnostic tools: biochips. This technology relies on the absorption of biomolecules (peptides, protein or cells) on a treated surface according to a patent-protected process. The company has developed and commercialized in 2016 a kit, HISTO SPOT HLA AB®, which allow to perform both the high resolution searching and identification of anti-HLA antibodies in patient sera. The antibodies profiles obtained with the kit show variable consistency rates with another more used test depending on the sera tested. The goal of the internship was to certify the coherence of the kits results by studying the impact of the quality of the antigens on the kit results. This work should permit Innobiochips to improve the methods used in quality control of the product in order to allow a reliable diagnostic for the patients.



Yann MENAGE

3A-classique

MERCK BIODEVELOPMENT

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Julie MARGRAIN**

Validation de méthode de mesure de conductivité sur TOCmètre Sievers M9

Le site de Merck Biodeveloppement de Martillac est spécialisé dans le développement et la production de protéines recombinantes à destination de l'homme pour des essais cliniques et pré-cliniques. La politique de travail sur site est donc extrêmement réglementée, et implique une rigueur et une traçabilité irréprochable, de l'arrivée d'une matière/équipement, jusqu'à la libération du lot de production final.

L'objectif de mon stage a été de valider une méthode de mesure de conductivité sur un équipement TOC mètre (ou COT mètre) au département Environnement du site. Ce département est garant du suivi de la qualité des réseaux de fluides (eaux du site, gaz, air comprimé), des eaux de procédé, des centrales de traitement d'air en zones de production et des laboratoires ainsi que les flux du site. Le TOC mètre Sievers M9, associé à un passeur d'échantillon en ligne, permet de mesurer le TOC (Total Organic Carbon) d'échantillons aqueux, et également leur conductivité grâce à une cellule présente en amont du circuit de mesure TOC. La conductivité étant déjà mesurée sur conductimètre classique (modèle de paillasse), l'objectif fût donc de coupler la mesure de TOC déjà qualifiée, avec celle de conductivité simultanément. Ce projet a été mis en place par la rédaction d'un protocole de validation et de l'application de ses tests, puis de la rédaction d'un rapport de validation. L'ensemble des tâches a été suivi de près par le département Assurance Qualité.

MARTILLAC • France

22/05/2018→19/09/2018

MERCK



non available abstract



Mayumi METE

3A-CBI

APHEA BIO

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Steven VANDENABEELE**

Contribution à la construction et à la caractérisation de la collection de microorganismes d'Aphea.Bio.

Aphea.Bio travaille sur la découverte de produits agro-biologiques pouvant améliorer l'Efficacité de l'Utilisation des Nutriments (Nutrient Use Efficiency: NUE); ou être utilisés en tant qu'agent de biocontrôle pour le maïs et le blé. Afin d'accroître leur collection de microorganismes, ce projet a pour principal but l'isolement de nouveaux microorganismes à partir de racines de maïs et de blé ayant été cultivés dans différents sols, et ayant de potentiels effets bénéfiques sur la croissance des plantes. Il est alors crucial que le microorganisme d'intérêt ait une viabilité de plusieurs semaines, voire plusieurs mois, lorsqu'il est appliqué sur une graine par exemple. Les spores microbiennes, principalement produits par les bactéries à GRAM + et les champignons, peuvent survivre plus longtemps. C'est pourquoi ce sont les organismes préférentiellement ciblés pour les tests in planta. Dans ce projet, des plants de maïs et de blés ont été cultivés dans 8 sols différents. Afin de favoriser particulièrement la croissance de GRAM + et de champignons, des milieux spécifiques ont été utilisés. Les souches cultivées sont ensuite identifiées par un séquençage de l'amplicon 16S pour les bactéries, et de l'amplicon ITS pour les champignons, et ajoutés à la collection. Une caractérisation des individus composant cette collection est aussi nécessaire, notamment afin de prioriser les essais in planta. Ainsi, différents tests ont été optimisés à Aphea.Bio pour parcourir la collection à la recherche de microorganismes pouvant optimiser la NUE des plantes. 1) La Fixation Biologique de l'Azote (Biological Nitrogen Fixation: BNF) est rendu possible par la présence génomique du gène nifH, qui est révélée par une réaction en chaîne de la Polymérase (Polymerase Chain Reaction: PCR). 2) D'un autre côté, la sécrétion d'ammonium pouvant être consommée par les plantes est aussi une autre caractéristique souvent retrouvée chez les promoteurs de croissance des plantes (plant growth promoting: PGP). Un test doit donc être mis en place afin de détecter la présence d'ammonium dans le milieu. Ici, deux méthodes ont été testées, et développées.

Au total, 4136 bactéries ont été isolées, leur ADN a été extrait, et envoyé au séquençage. Jusqu'à présent, l'équivalent de 581 isolats ont été séquencés et analysés. Suite à cela, 146 bactéries ont été ajoutées à la collection. Parmi celles-ci, 30% des bactéries sont identifiées comme GRAM positive, provenant majoritairement de choc thermique. De plus, 111 champignons ont été isolés. Deux protocoles pour l'extraction d'ADN ont été comparés, afin de sélectionner le plus adapté pour l'entreprise. Après identification des individus par leur séquences ITS, seuls les champignons non pathogéniques ont été ajoutés à la collection. Au total, 30 fungi ont été ajoutés à la collection.

Le protocole de l'amplification du gène nifH a été adapté à partir des travaux de Turk et al. (2014) afin d'assurer une amplification pour plusieurs souches de bactéries.

La détection de l'ammonium dans le milieu s'est basée sur les études de Bucur et al. (2006), and Ortiz-Marquez et al. (2012), utilisant la réaction de Berthelot dans le surnageant des cultures.

Zwijnaarde • Belgique

01/06/2018—31/10/2018



Contribution to the build-up and characterisation of the Aphea.Bio proprietary microorganism collection.

Aphea.Bio focuses on discovering agro-biologics based on microorganisms that can increase Nutrient Use Efficiency (NUE) or act as biocontrol agent on wheat and maize. To expand Aphea.Bio's microorganism collection, the main aim of this project is to isolate, from roots of maize and wheat grown in different soils, new microorganisms with potentially beneficial properties for plants. In the end, it is crucial that the microorganisms remain viable for weeks and even months when e.g. coated around or applied to the seed: microbial spores, primarily produced by GRAM+ bacteria and fungi, can survive better over time. This is the reason why GRAM+ and fungi are preferentially isolated for further testing their potential beneficial properties in planta.

In this project novel microorganisms were isolated from 8 different soils in which maize and for wheat were grown. To particularly promote growth of GRAM+ bacteria or fungi, specific selective media and heat shock treatments were used. Cultured strains were further identified by 16S amplicon sequencing for bacteria, and ITS amplicon sequencing for fungi, and added to the collection of Aphea.Bio. This ever-growing collection needs to be characterized in more detail, so as to prioritize a selection for the in planta testing. For that purpose, different assays are being optimized at Aphea.Bio to screen for identification of microbes that have an increased chance to enhance plant NUE: 1) biological nitrogen fixation (BNF) test: is solely made possible through the genomic presence of the nifH gene and thus the set-up a Polymerase Chain Reaction (PCR) to specifically detect nifH is essential. 2) On the other hand, ammonium secretion by the microorganism to be consumed by the plant is another indication for potential plant NUE promoting characteristics, hence the development of an ammonium detection assay is essential. In this project, both assays have been developed and further optimised.

In total, 4136 bacterial colonies have been isolated, their DNA extracted, and sent for identification by 16S sequencing. Up to today, sequencing results have been received for ~580 colonies. Around 146 bacteria (~25%) isolated are added to the collection. Among them, 30% are identified as GRAM+ bacteria, mostly coming from the heat shock treatment. The other ones belonged to the GRAM-group of bacteria. Besides, 111 fungal colonies have been isolated. For the identification of the strains, two fungal DNA isolation protocols have been tested in order to select the most effective. After identification based on ITS sequencing, only the non-human/non-plant pathogenic fungi are added to the collection. In total, 30 fungi have been added to the collection.

The nifH PCR amplification protocol from Turk et al. (2014) was modified and optimised so as to result in a stable nifH detection across the different isolated strains

The ammonium assay was adapted from Bucur et al. (2006), and Ortiz-Marquez et al. (2012), resulting in an assay optimized for ammonium concentration measurements in the supernatants of the tested microorganism cultures.



Jimmy OLIVAIN

3A-CBI

CBMN UMR 5248

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Jérémie BURATTO**

Production, purification et caractérisation de protéines recombinantes complexées avec des ligands peptido-uriques.

L'idée principale du stage a été de mimer un peptide capable de se fixer à une protéine et de moduler sa fonction, à l'aide de molécules synthétiques. Les ligands « mimes » utilisés sont des peptides dans lesquels certains acides aminés naturels ont été substitués par des résidus uréiques non naturels. Les résidus uréiques sont des analogues d'acides aminés γ , liés entre eux par des liaisons uréiques. Les chimères obtenues ont alors une stabilité et une biodisponibilité améliorées par rapport au peptide mimé, ce qui en fait un nouveau type de médicament potentiel.

L'objectif du premier projet est de mimer un agoniste naturel de GLP-1R (Glucagon-Like Peptide 1 Receptor). Malgré sa courte demi-vie, son ligand GLP-1 permet de potentialiser la production d'insuline et de réprimer la sécrétion de glucagon. Ce récepteur est donc une cible privilégiée pour traiter le diabète de type 2. La partie extracellulaire de GLP-1R a été produite par des bactéries et extraite des corps d'inclusion obtenus. La protéine soluble mais dénaturée a ensuite été purifiée et renaturée. Enfin son état de renaturation a été caractérisé par fluorescence.

Le second projet consiste à mimer le domaine de la protéine suppresseur de tumeur p53 qui se lie naturellement à la protéine hDM2 (humain Double Minute 2). Contrairement au projet précédent il s'agit d'inhiber leur interaction. En effet hDM2 atténue l'activité anticancéreuse de p53 notamment en se fixant à cette dernière. Les ligands peptido-uréiques développés ont donc pour objectif de remplacer p53 sur le site de liaison d'hDM2 afin de potentialiser l'effet de p53 chez les malades souffrant d'un cancer. La protéine hDM2 a donc été produite et purifiée, puis elle a été co-cristallisée avec différentes chimères.

PESSAC • France

14/05/2018 → 14/09/2018



Production, purification and characterisation of recombinant proteins bound to peptido-ureic ligands.

The main idea of the internship was to mimic a peptide able to bound a protein and modulate its function thanks to synthetic molecules. The mimic ligands used are peptides which have some of their natural amino acids substituted by unnatural ureic residues. These ligands are γ amino acids analogues, linked together by ureic bounds. In comparison of imitated peptides, chemically synthesized chimeras have enhanced stability and bioavailability properties that makes of them a potential new kind of medicine.

The aim of the first project is to mimic a natural ligand of GLP-1R (Glucagon-Like Peptide 1 Receptor) able to activate it. In spite of its short half-life, its GLP-1 ligand not only allows potentiation of insulin production but also repress glucagon secretion. As a consequence, this receptor is a privileged target to treat type 2 diabetes. Extracellular region of GLP-1R was produced by bacteria and extracted from inclusion bodies obtained. Soluble but unfolded protein was then purified and folded. Finally the folded state of GLP-1R was characterized by fluorescence.

The second project aims to imitate the tumor suppressor protein p53 domain that naturally bind to hDM2 (human Double Minute 2) protein. In contrast with the previous project, the objective is to inhibit their interaction. Indeed hDM2 when bound to p53 decreases its anticancer effects. The peptido-ureic ligands developed have to replace p53 in the binding site of hDM2 to potentiate p53 effects in patient who have a cancer. So hDM2 was produced and purified, then it was characterized and co-crystallized with different chimeras.



Margaux OUVRY

3A-CPRO

VERNALIS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Ben DAVIS**

Application du système SpyTag/SpyCatcher en outil général pour la biophysique

Le développement de nouveaux outils biophysiques est essentiel à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques afin de générer des données avec un haut degré de fidélité, tout en minimisant les coûts et l'utilisation d'échantillons. Nous présentons ici l'utilisation de la technologie SpyTag/SpyCatcher pour le développement d'un test prêt à l'emploi mesurant l'efficacité des composés produits par l'entreprise sur une protéine cible (Hsp90). Le système SpyTag/SpyCatcher est formé d'une protéine artificiellement divisée en deux avec d'un côté un peptide SpyTag de seulement 13 acides aminés et de l'autre le domaine SpyCatcher. Ces deux partenaires sont capables de former un lien isopeptidique pour reconstituer la protéine initiale. Nous avons adapté le domaine SpyCatcher en tant que rapporteur du signal en MST et SPR. L'interaction covalente du système de liaison SpyTag/SpyCatcher a été utilisée pour adresser Hsp90 fusionnée à SpyTag rapidement, spécifiquement et irréversiblement au SpyCatcher, aboutissant à la formation d'un complexe protéique stable. L'interaction de différents composés sur Hsp90 a été mesurée en SPR et MST. Les effets doses réponses observés étant similaires à ceux obtenus pour Hsp90 isolée, nous avons démontré la faisabilité d'utiliser ce système pour évaluer l'effet de composés sans modification du signal mais surtout en évitant l'étape de marquage de Hsp90. Cette preuve de concept permettra à l'entreprise de développer un outil de screening de molécules à bas coûts.

Cambridge • Royaume-Uni

07/05/2018 → 28/09/2018



Applicability of the SpyTag/SpyCatcher System as a general tool for biophysics.

Novel biophysical tools are essential for drug discovery and development to generate data with high precision meeting drug safety and quality requirement while minimizing cost time and sample consumption. Here we describe the use of SpyCatcher/SpyTag technology for developing a ready-made assay testing the efficiency of various compounds, designed by the company, on a target protein (Hsp90). The SpyTag/SpyCatcher system is an engineered split protein which forms an isopeptide bond between a 13 amino acid peptide sequence (SpyTag) and a 13kDa folded protein (SpyCatcher). We designed a chemically modified SpyCatcher as a reporter for signal detection in SPR and MST able to efficiently and irreversibly capture SpyTag-Hsp90. The tight covalent interaction between SpyCatcher and SpyTag allowed for a stable complex on which compounds have been screened and their effect on P has been monitored by SPR and MST. The binding data obtained being identical to those obtained for Hsp90 on its own, we have demonstrated the feasibility of using this system without interfering of the binding data and most importantly without having to label Hsp90 and optimised the assay for each case. The results provide proof-of-concept for SpyTag/SpyCatcher system's to be used as a fast, specific, and genetically encoded route to bring unlabelled Hsp90 to the SpyCatcher partner for rapid biophysics assays. The system may serve the company as a generic tool for the cost-effective development of a screening process of drug candidates.



Marlène PAULUZZI

3A-CPRO

GENZYME LYON

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Delphine MARTIANO**

Etude d'équivalence entre deux cytomètres en flux pour le test d'activité lymphocytotoxique de Thymoglobuline®.

Genzyme Polyclonals est une filiale de la société Genzyme qui appartient au groupe Sanofi. Le site de Lyon produit le médicament Thymoglobuline®, un immunosuppresseur composé d'anticorps polyclonaux de lapins anti-lymphocytes humains. Il est prescrit essentiellement en prévention et en traitement du rejet de greffe et de l'aplasie médullaire. Son action vise à détruire les lymphocytes humains à l'origine du rejet de greffe. Par conséquent, l'activité lymphocytotoxique de Thymoglobuline® est un paramètre majeur mesuré à différentes étapes du procédé de fabrication dans le but de garantir l'efficacité du traitement et la sécurité des patients. Un test d'activité basé sur la cytotoxicité dépendante du complément et une mesure par cytométrie en flux permettent de déterminer l'activité de Thymoglobuline®. Ce test est réalisé en routine au sein des laboratoires du contrôle qualité pour valider la libération du produit sur le marché. Cependant, les cytomètres utilisés aujourd'hui et les pièces détachées ne seront plus commercialisés dans quelques années. Par anticipation, de nouveaux cytomètres ont été achetés ce qui a entraîné un transfert des méthodes analytiques. Afin qu'il n'y ait pas d'impact sur les résultats de l'activité lymphocytotoxique de Thymoglobuline®, il est important de démontrer l'équivalence de l'ancien et du nouvel équipement. C'est au sein du laboratoire ATS (Analytical and Technology Support), que j'ai pu travailler sur l'élaboration de l'étude d'équivalence entre les deux cytomètres en flux. Des pré-tests ont permis d'effectuer les réglages nécessaires du nouvel équipement pour obtenir des résultats équivalents à ceux obtenus avec l'ancien appareil. Par la suite, différentes conditions opératoires ont été testées permettant de choisir la plus adaptée pour atteindre l'équivalence.

LYON • France

02/05/2018—28/09/2018



Equivalence study between two flow cytometers for the Thymoglobulin® bioassay.

Genzyme Polyclonals is a subsidiary of Genzyme company belonging to the Sanofi Group. Its site in Lyon, produces the drug Thymoglobulin®, an immunosuppressant composed of rabbit polyclonal antibodies against human lymphocytes. Thymoglobulin® is used in the prevention and treatment of transplant rejection and bone marrow suppression destroying the human lymphocytes that cause transplant rejection. Therefore, the Thymoglobulin® activity is a major parameter measured at different stages of the manufacturing process in order to ensure treatment efficacy and patient safety. A bioassay based on complement-dependent cytotoxicity and flow cytometry measurement determine the Thymoglobulin® activity. This routine test is performed in quality control laboratories to approve the marketing of the product. However, cytometers and spare parts will be not marketed in a few years. New cytometers were purchased to prevent failures and analytical methods should be transferred. It is important to prove the equivalence between old and new equipment so as not to have an impact on the results of the Thymoglobulin® activity. In ATS (Analytical and Technology Support) laboratory, I worked on the development of the equivalence study between two flow cytometers. After pre-tests on the new equipment to make adjustments compared with old equipment, different operational conditions have been tested to choose the most suitable to achieve equivalence.



Lucie PERRAULT

3A-CPRO

INSERM U1211 - Unité MRGM

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Bénard GIOVANNI**

Caractérisation et localisation des FBXL, protéines impliquées dans la régulation du métabolisme mitochondrial.

Les maladies rares comme les maladies mitochondriales nécessitent une recherche fondamentale et appliquée afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques aux patients. Cette recherche s'est orientée sur la flexibilité et la régulation du métabolisme énergétique dans la mitochondrie, car l'identification d'un déficit bioénergétique mène vers la découverte de cibles d'intérêt thérapeutique. La plasticité bioénergétique d'une cellule repose sur la dégradation de protéines, réalisée par ubiquitination.

Les protéines FBXL sont un acteur important de l'ubiquitination dans la mitochondrie. Le but du stage a donc été de caractériser ces protéines en étudiant l'expression tissulaire des FBXL par qPCR. Ces expérimentations sont nécessaires en vue de connaître les tissus possédant la plus forte concentration et ainsi étudier ces organes dans le cadre de modèles animaux. Il a aussi été étudié la localisation intracellulaire des FBXL : en fonction de la FBXL ou de sa séquence, elle peut être intracytoplasmique ou présente dans le réseau mitochondrial. Cette analyse a été réalisée par microscopie électronique couplée à de l'immunofluorescence.

Enfin, il a été étudié par qPCR l'impact d'une inhibition de l'expression des FBXL sur la quantité des autres FBXL. Cette analyse a pour finalité de placer les différentes FBXL dans une cascade de régulation de l'ubiquitination. L'inhibition de la synthèse des FBXL a été analysée par SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) par une approche protéomique. Cette analyse permet d'étudier la variation de protéines marquées au cours du temps et ainsi d'obtenir une information dynamique sur le temps de demi vie des protéines mitochondriales.

BORDEAUX • France

04/06/2018—27/07/2018



Characterization and localization of FBXL, proteins involved in the regulation of mitochondrial metabolism

Rare diseases such as mitochondrial diseases require basic and applied research to provide new therapeutic approaches for patients. This research is focused on the flexibility and regulation of energy metabolism in the mitochondria, because the identification of a bioenergetic deficit leads to the discovery of drug targets. Cellular bioenergetic plasticity is based on protein degradation with ubiquitination.

FBXL proteins are an important player in ubiquitination in mitochondria. Therefore, it is important to characterize these proteins by studying the tissue expression of FBXL by qPCR. These experiments are necessary to identify tissues with the highest concentration and thus study these organs with animal models. The intracellular localization of FBXL has also been studied: depending on the FBXL or its sequence, it can be intracytoplasmic or present in the mitochondrial network. This analysis was performed by electron microscopy combined with immunofluorescence. We also studied the impact of inhibition of FBXL expression on the quantity of other FBXLs. The purpose of this analysis (by qPCR) is to place the different FBXLs in a cascade of regulation of ubiquitination. Finally, the inhibition of FBXL synthesis was studied by SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) with a proteomic approach. With SILAC, we studied the variation of labeled proteins (heavy and light) over time and thus obtain a dynamic information on the half-life of the mitochondrial proteins.



Eva PHILIPPON

Cell Guidance Systems

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Raj GANDHI

Optimisation de la production de microcristaux PODSTM en cellules d'insectes par ingénierie du génome de baculovirus.

La technologie « Polyhedrin Delivery System » (PODSTM) fournit une solution efficace au problème de l'instabilité inhérente des protéines. La technologie PODSTM est basée sur les propriétés naturelles de la protéine polyédrine qui forme des cristaux lorsqu'elle est exprimée dans une cellule. Une certaine famille de virus pathogène des insectes, appelé baculovirus, a la capacité de produire des cristaux de polyédrine dans les larves infectées afin de protéger les virions en leur sein. Des baculovirus recombinants sont génétiquement modifiés pour contenir un gène codant pour une protéine d'intérêt qui est exprimé dans les cellules d'insectes sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine. En résulte alors la formation de cristaux intracellulaires robustes qui encapsulent et protègent la protéine cargo recombinante pendant une longue période, créant également des gradients de concentration localisés lorsqu'ils sont attachés à une surface. En plus de produire de nouveaux microcristaux PODSTM pour leur commercialisation ou dans le cadre de collaborations de recherche, l'équipe travaille au développement et à l'amélioration du processus de production. L'un de mes projets consistait à améliorer la production de PODSTM en modifiant le génome de baculovirus. Ce dernier contient plusieurs gènes auxiliaires qui ne sont pas essentiels à la réplication dans les cellules d'insectes et qui peuvent être exprimés en concurrence avec la polyédrine. La suppression de ces gènes permettrait d'éliminer un poids génétique en faveur de la production de la polyédrine. Tout d'abord, l'insert remplaçant la séquence non désirée a été créé par OE-PCR. Ensuite, une co-transfection a été réalisée pour introduire le génome de baculovirus recombinant dans des cellules d'insectes. Une protéine fluorescente a été utilisée comme protéine cargo pour visualiser les PODSTM recombinants dans les cellules. Le screening des clones de baculovirus a déterminé la proportion de clones au génome correctement modifié.

CAMBRIDGE • Royaume-Uni

07/05/2018 → 28/09/2018



Modifying the recombinant baculovirus backbone to enhance PODSTMTM microcrystal production in insect cells.

Cell Guidance Systems has developed a "Polyhedrin Delivery System" (PODSTM) to meet the inherent protein instability issue. It is based on the natural properties of the polyhedrin protein which forms crystals when expressed in a cell. A certain family of insect pathogen virus, called baculovirus, has the ability to produce polyhedrin crystals in infected larvae to protect encased virions. Recombinant baculoviruses are genetically modified to contain a foreign gene of interest that can be expressed in insect cells under the control of the strong polyhedrin promoter. The polyhedrin protein thus forms robust intracellular crystals, which protect the encased cargo protein for prolonged periods in the environment and create localized concentration gradients when attached to a surface. In addition to producing new PODSTM for customers or research partners, the PODSTMTM team works on developing and improving the process. One of my projects was to enhance the PODSTMTM production by altering the baculovirus backbone. The baculovirus genome contains several auxiliary genes which are non-essential for replication in insect cells, and may be expressed concurrently with polyhedrin. The deletion of these genes would remove a genetic burden in favour of the polyhedrin production. To begin with, the insert replacing the undesired backbone sequence was made by Overlap Extension PCR. Then a co-transfection was performed to introduce the recombinant baculovirus genome in insect cells. A fluorescent protein was used as the cargo protein to visualise recombinant PODSTMTM in the cells. Screening the baculovirus clones by PCR determined the proportion of clones with the backbone modified.



Marie PICHON

INSERM U 1218

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Béatrice TURCQ

Application d'une technique de détection ultra-sensible des ARN appelée SHERLOCK à la détection des ARNm BCR-ABL1 chez les patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC).

La Leucémie Myéloïde Chronique est une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie et de son équivalent moléculaire, le gène BCR-ABL1. Le gène de fusion fonctionnel BCR-ABL1 est traduit en une protéine à activité tyrosine kinase constitutive rendant ABL1 oncogène. La conséquence de cette activité tyrosine kinase incontrôlée est une hyperactivité, une perte de la régulation et de la spécificité de l'activité tyrosine kinase. Ce dérèglement de la prolifération entraîne alors une accumulation des granulocytes dans le sang. Une partie de ces granulocytes est anormale, les cellules sont immatures, c'est-à-dire que leur développement n'est pas terminé lorsqu'elles passent dans le sang. Des traitements contre la LMC existent, ce sont les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) tels que l'imatinib qui ciblent l'activité kinase de la protéine BCR-ABL1. Des essais cliniques d'arrêt de l'imatinib ont montré qu'environ 50% des patients sont dits « guéris » : la maladie ne réapparaît pas. En revanche, les autres patients rechutent, ce qui signifie que le transcrit BCR-ABL1 des cellules de LMC est de nouveau détectable. Ces rechutes seraient dues à la persistance d'un clone malin dont le faible niveau de transcrit BCR-ABL1 n'avait pas pu être détecté par les techniques classiques. L'objectif de mon stage, est donc, d'appliquer une nouvelle méthode de détection d'ARN ultra-sensible, basée sur la technologie CRISPR-Cas13 déjà décrite précédemment appelée SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) à la détection de l'ARNm BCR-ABL1. Ce système utilise les propriétés de la protéine Cas13a de *Leptotrichia wadei* qui permet de cibler les molécules d'ARN. Cette protéine forme avec un crRNA un complexe qui permet sa fixation sur les ARN dont la séquence est complémentaire à 30 nucléotides du crRNA. Cette fixation entraîne l'activation de l'activité nucléase non spécifique de la Cas13a qui, grâce à la présence d'un ARN reporter fluorescent, permet de quantifier la séquence cible présente dans l'échantillon.

3A-Classique

Bordeaux Cedex • France

14/05/2018 → 13/07/2018



Application of SHERLOCK, a Highly Sensitive RNA Detection Technique, to the Detection of BCR-ABL1 RNAs in Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML).

Chronic myeloid leukemia is a hematopoietic stem cell disease characterized by the presence of the Philadelphia chromosome that results from the reciprocal translocation t(9;22) and leads to the formation of the BCR-ABL1 fusion oncogene. This functional fusion gene is translated into a protein with constitutive tyrosine kinase activity rendering ABL1 oncogenic. A protein with constitutive tyrosine kinase activity meaning that it is hyperactive and shows a loss of regulation and specificity for its activity. Thus expression of BCR-ABL1 in hematopoietic stem cells disrupts their proliferation and differentiation and ultimately leads to an accumulation of granulocytes in the blood. These granulocytes are abnormal; they are immature cells whose development is not complete when they pass into the blood.

Anti-CML therapies are tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as Imatinib that target the kinase activity of BCR-ABL1 protein. After stopping imatinib, about 50% of patients are said to be "cured": the disease does not reappear, the other patients relapse, showing symptoms of disease and requiring further treatment. These relapses are due to the persistence of a malignant clone whose low level of BCR-ABL1 transcripts could not be detected by conventional techniques.

The objective of my internship, therefore, is to apply a new ultra-sensitive RNA detection method, based on the CRISPR-Cas13 technology described previously called SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) to the detection of BCR-ABL1 mRNA. This system uses the properties of the *Leptotrichia wadei* protein Cas13a, which makes it possible to target the RNA molecules. This protein forms a complex with a crRNA, which enables binding to RNAs that are complementary in sequence to the 30 nucleotides of crRNA. This binding results in the activation of the non-specific nuclease activity of Cas13a, which thanks to the presence of a fluorescent reporter RNA, makes it possible to quantify the target sequence present in the sample.



Nicolas PRUDON

3A-Classique

LAMP Biomaterials

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Sidi BENCHERIF**

Optimisation de cryogels enzymatiquement actifs pour l'augmentation des concentrations d'adénosine locales.

L'implication de nucléotides extracellulaires et de l'adénosine dans un ensemble de réponses spécifiques aux cellules a depuis longtemps été connu et étudié mais l'implication de ces molécules de signal en tant que médiateurs purinergiques de l'inflammation et de l'immunité n'a été mise en évidence que récemment (M.J.L. Bours et al, 2006). Dans cette étude, le développement de cryogels à base d'acide hyaluronique fonctionnalisés avec une enzyme de type ATP diphosphatase, l'apyrase, a été réalisé afin de permettre la diminution de l'ATP local et augmenter les concentrations en adénosine. Les différentes activités enzymatiques, ATPase, ADPase et AMPase de l'enzyme incorporée au cryogel ont été évaluées au cours du procédé de fabrication des cryogels, après pegylation et cryopolymérisation. Une stratégie d'amélioration de l'activité résiduelle dans le cryogel a alors été mise en place. L'utilisation de tréhalose à 1 % (w/v) en tant que lyoprotectant lors de l'étape de pegylation a permis une considérable amélioration de l'activité résiduelle avec plus de 60 % d'activité recouvrée après pegylation contre 1 % obtenu précédemment. Les propriétés mécaniques remarquables des cryogels comme leur résistance mécanique, la présence de larges pores interconnectés, et leur capacité à retrouver leur forme après des déformations considérables (Bencherif et al, 2012) ont été maintenues permettant leur injection par seringue. Des tests de viabilité qualitatifs utilisant des cellules fibroblastes 3T3 ont ensuite été réalisés. Les résultats n'étaient cependant pas conclusifs, suggérant un potentiel cytotoxique des cryogels enzymatiquement actifs. La biocompatibilité des cryogels à base d'acide hyaluronique ayant déjà été démontrée (Rezaeeyazdi et al, 2018), le protocole utilisé ou le procédé de fabrication ont pu induire la cytotoxicité observée. Finalement, l'activité enzymatique des cryogels a été prédite et corrélée pour des applications potentielles in vivo. Les cryogels fonctionnalisés avec de l'apyrase présentent un grand potentiel pour différents contextes cliniques comme l'immunothérapie.

BOSTON • Etats-Unis

08/05/2018—28/09/2018

LAMP Biomaterials



Optimization of functionalized cryogels with immunosuppressive properties for autoimmune diseases or transplantation treatment.

The involvement of extracellular nucleotides and adenosine in an array of cell-specific responses has long been known and appreciated but it was only recently that their involvement as purinergic mediators in inflammation and immunity has been shown (M.J.L. Bours et al, 2006). In this study, the development of hyaluronic acid-based cryogels functionalized with an ATP diphosphatase enzyme, namely apyrase, was performed in order to allow local ATP depletion and increased adenosine levels. The different enzymatic activities of the apyrase: ATPase, ADPase and AMPase were evaluated during the manufacturing process of cryogels, after the pegylation and the cryopolymerization steps. A strategy for the optimization of the enzymatic activity within the cryogel was then established. The use of a lyoprotectant at 1 % (w/v) as during the pegylation step allowed over 60 % of activity recovery against 1 % of residual activity previously obtained. The remarkable mechanical properties of the cryogels such as mechanical robustness, large interconnected pores, and reversible dramatic deformations (Bencherif et al, PNAS, 2012) were retained allowing syringe injectability. Viability assays were then performed using 3T3 fibroblast cells. The results were however non-conclusive, suggesting potential cytotoxicity of enzymatically active cryogels. As the cytocompatibility of hyaluronic acid-based cryogels have been already demonstrated (Rezaeeyazdi et al, Materials, 2018), the manufacturing process or the experiment protocol may have led to the resulting cytotoxicity. Finally, based on our preliminary results, the enzymatic activity of cryogels were predicted and correlated for potential in vivo applications. Apyrase-functionalized cryogels have a great potential in different clinical conditions including immunotherapy.



Nicolas RICHEZ

3A-Classique

GLENMARK PHARMACEUTICALS SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Brice GASSIAT**

Création et analyse de bases de données pour les biomolécules de Glenmark (GBR) traçant la fabrication de la forme galénique.

Le site de Glenmark à La Chaux-de-Fonds en Suisse est orientée sur la recherche, le développement et la fabrication de nouvelles entités biologiques avec notamment la création de leur plateforme BEAT® (Bispecific Engagement by Antibodies based on T cell receptor) spécialisée dans les anticorps bispécifiques depuis 2014. Ce projet émane de l'équipe de formulation qui est en charge de la réalisation des études de stabilité des produits, du développement ainsi que du suivi de la fabrication de la forme galénique des produits. Le but du projet était de compiler les données sur la fabrication de ces formes pour les biomolécules de Glenmark afin de créer des bases de données permettant d'avoir un accès rapide aux informations ainsi qu'un suivi de certains paramètres de cette fabrication sur tous les batches manufacturés. Les informations nécessaires sont obtenues principalement grâce à des batch records qui sont des documents de traçabilité permettant d'assurer le bon déroulement du procédé mais aussi le suivi de plusieurs paramètres essentiels à ce dernier. Ces bases de données ont ensuite été utilisées pour étudier l'impact des différents paramètres sur la forme galénique de la molécule.

LA-CHAUX-DE-FONDS • Suisse

18/06/2018—28/09/2018



Creation and Analysis of GBR (Glenmark's biomolecules) Data Tracker for the Drug Product Manufacturing

Glenmark's site at La Chaux-de-Fonds in Switzerland is oriented on the research, development and the manufacturing of New Biological Entities (NBE) with notably the creation of their BEAT® platform (Bispecific Engagement by Antibodies based on T cell receptor) specialized in bispecific antibodies since 2014. The project originated from the formulation team who is in charge of the realization of stability studies for the different products, the development and the monitoring of the manufacturing of the Drug Product (DP). The aim of the project was to compile data on the DP manufacturing for all the Glenmark's biomolecules in order to create databases which allow the quick access to information and the follow-up of the DP process parameters. The information used were collected especially from batch records which are traceability documents allowing the smooth running of the process and the monitoring of essential parameters. Once gathered, the data were used to analyze the impact of several process parameters on the drug product.



Elise SEMERENA

3A-Classique

TALBOT LAB

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Sébastien TALBOT

Etude de l'interaction entre neurones sensoriels et cancer.

Bien que des progrès considérables aient été réalisés au cours des dernières années, le succès actuel de l'immunothérapie du cancer est limité par sa variabilité entre patients et types de cancer. Aujourd'hui, cette maladie constitue un des principaux problèmes de santé en France. Au sein de son laboratoire, le Dr Talbot a montré que les systèmes immunitaire et sensoriel travaillent de concert pour promouvoir la défense de l'hôte et l'homéostasie. Cependant, dans certains cas, cette interaction bidirectionnelle peut être inadaptée et contribuer à la physiopathologie du cancer. Dans ce contexte, mon travail au cours de ce stage a porté sur deux projets liés à l'étude de l'interaction entre neurones sensoriels et cancer. Le premier consistait à étudier cette interaction in vitro, via la mise en place de co-cultures de neurones sensoriels avec des cellules de mélanome. L'étude par imagerie à fluorescence de la longueur des neurites des neurones nous a permis de montrer que ces derniers présentent une morphologie distincte en présence de cellules cancéreuses. Le second projet avait pour but de démontrer que le blocage des neurones sensoriels a un impact sur le développement de la tumeur in vivo, sur la résistance à la chimiothérapie et sur l'immunosurveillance du cancer. Pour cela, nous avons induit des mélanomes au sein de souris contrôles et de souris dépourvues de neurones sensoriels, puis nous les avons traitées avec un agent anticancéreux. Nos données suggèrent qu'au sein des souris génétiquement modifiées, le développement des mélanomes et l'effet de la chimiothérapie sont plus importants. De plus, l'étude des marqueurs d'épaissements à la surface des cellules T CD8+ a montré un plus fort affaiblissement du système immunitaire chez ces mêmes souris. Tout ceci suggère que les neurones sensoriels sont impliqués dans le processus de cancérisation et pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de cette maladie.

MONTREAL • Canada

21/05/2018 → 14/09/2018



Study of the interaction between sensory neurons and cancer.

Although considerable progresses have been made in recent years, the current success of cancer immunotherapy is limited by its variability among patients and cancer types. Cancer remains one of the main health problems in France. In his laboratory, Dr. Talbot showed that the immune and sensory systems work together to promote host defense and homeostasis. However, in some cases, this bidirectional interaction may be maladaptive and contribute to disease pathophysiology such as cancer. In this context, my work during this internship focused on two projects related to the study of the interaction between sensory neurons and cancer. First, we study this interaction in vitro, through co-cultures of sensory neurons with melanoma cells. Fluorescence imaging of the neurite outgrowth showed a distinct morphology in the presence of cancer cells. Second, we aim to demonstrate that the blockade of sensory neurons has an impact on tumor development in vivo, the resistance to chemotherapy and cancer immunosurveillance. For this purpose, we induced melanomas in control mice and mice without sensory neurons, and then we treated them with an anticancer agent. These experiments showed that sensory neuron depleted mice present an increase in tumor growth and effect of chemotherapy, as well as elevated expression of immune checkpoints receptors on the surface of CD8+ T cells. Overall, sensory neurons appear to drive cancer progression and could be a new therapeutic target in the treatment of this disease.



Carole SILVA

3A-Classique

Bone Therapeutics SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Carmen BRENNER

Développement, optimisation et implémentation d'un test d'efficacité in vitro et participation à la caractérisation du profil génique du produit de thérapie cellulaire par RT-qPCR.

Bone Therapeutics développe des produits de thérapie cellulaire à destination de patients souffrant de pathologies osseuses et orthopédiques. Les produits sont élaborés à partir de cellules mésenchymateuses prélevées de moëlle osseuse humaine, cultivées pour les multiplier et les induire dans la voie de différenciation ostéoblastique. J'ai réalisé mon stage au sein du département Contrôle Qualité (QC), dirigé par Mme Carmen Brenner. Le QC contrôle les matières premières et les produits finis afin d'assurer qu'ils soient sans danger et de la qualité requise. Actuellement, dans le cadre du développement d'un nouveau produit de thérapie cellulaire, le QC assure également un rôle de support à la mise au point des tests de caractérisation de ce produit. Lors de ce stage, j'ai travaillé sur deux projets liés au développement du nouveau produit.

Le premier projet a consisté en la mise au point d'un test d'efficacité basé sur la mise en évidence de nodules de minéralisation produits spécifiquement par des cellules ostéoblastiques, dans l'objectif final d'implémenter la méthode comme test de routine QC sur le nouveau produit. Pour ce faire, il a été nécessaire de caractériser la méthode d'induction de la minéralisation mise en évidence par la coloration à l'ARS. La caractérisation de la méthode vise à prouver qu'elle permet de détecter de manière spécifique et répétable les nodules de minéralisation. Pour intégrer ce test de minéralisation au système qualité, j'ai cultivé des lignées cellulaires humaines afin d'obtenir des cellules témoins positifs (SaOS-2) et négatifs (MG-63) de la minéralisation. Sur le nouveau produit, il a été montré que la méthode était répétable en termes de précision intra-essai (réplicats techniques homogènes) et précision inter-essai (résultats non opérateur-dépendants).

Le second projet a porté sur la caractérisation du nouveau produit par RT-qPCR dans le but de comparer l'expression génique des cellules (i) mises fraîchement en culture puis cryoconservées ou (ii) décongelées avant la culture puis conditionnées fraîches. Nous avons mis en évidence le profil d'expression de gènes de différenciation et de prolifération au cours de la croissance des cellules. Lors des deux procédés, les cellules ont présenté une tendance à la prolifération en première phase de croissance puis se sont engagées dans la voie de différenciation ostéoblastiques en seconde phase de croissance.

BRUXELLES • Belgique

02/05/2018 → 14/09/2018



Development, optimization and implementation of an in vitro potency assay and participation in the characterization of the new cell therapy product by qRT-PCR.

Bone Therapeutics develops cell therapy products in the field of orthopaedics and bone diseases. The products are derived from ex vivo cultured bone marrow cells of adult donors. The mesenchymal stem cells are grown to multiply and be induced in the osteogenic differentiation pathway. I did my internship in the Quality Control department (QC), directed by Ms Carmen Brenner. The QC controls the raw materials and final products to ensure that they are safe and of the required quality. The company presently develops a new cell therapy product for which the QC participates in the tests of characterization. During my internship, I worked on two different projects related to this current development.

The first project aimed at developing an in vitro potency assay based on the detection of mineralization nodules specifically produced by osteoblastic cells, for its further implementation as a routine QC test on the new product. For such, it was necessary to characterize the analytical method of detection of the mineralization nodules by ARS staining. The characterization of the method is intended to demonstrate that it allows specific and repeatable detection of mineralization nodules. For the integration of the method into the quality system, I cultivated human cell lines to obtain positive (SaOS-2) and negative (MG-63) controls of mineralization. Tested on the new product, the method was repeatable as its intra-assay precision (homogeneous technical duplicates) and inter-assay precision (non-operator dependent results) were validated.

The second project focused on the characterization of the new cell therapy product by qRT-PCR. The aim was to compare the gene expression profile of (i) freshly cultured cells then cryopreserved or (ii) thawed before cultivation then conditioned fresh. We have demonstrated the expression profile of differentiation and proliferation genes during cell growth. Over the two processes, the cells showed a tendency to proliferate in the first growth phase and subsequently entered the osteoblast differentiation pathway in the second growth phase.



Clara SOULARD

3A-Classique

TALBOT LAB

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Sébastien TALBOT**

Etude de l'activation directe des nocicepteurs dans le cadre des immunités de type Th1 et Th2.

Les nocicepteurs sont des sous-types de neurones sensoriels périphériques qui partagent la capacité des cellules immunitaires de détecter les menaces endo et exogènes. Les systèmes nerveux et immunitaires sont généralement considérés comme deux entités autonomes et indépendantes. Pourtant, de nombreuses études suggèrent qu'ils interagissent et coopèrent. Cellules immunitaires et neurones sensoriels communiquent de manière bidirectionnelle et adaptative par l'intermédiaire des neuropeptides et des cytokines. Cependant, si ce dialogue permet la coordination des deux systèmes dans la protection de l'organisme contre les dangers, son dysfonctionnement peut aussi contribuer à certaines pathologies. Ainsi, définir les mécanismes contrôlant les interactions neuro-immunitaires; identifier comment et quelle population de neurones sensoriels régule les réponses du système immunitaire inné et adaptatif, permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies médicales. Les recherches actuelles menées au laboratoire du Dr. Talbot visent à comprendre la capacité des nocicepteurs à détecter les allergènes, d'une part, et leur rôle dans l'immunosurveillance du cancer, d'autre part. Mon travail au cours de ce stage a porté principalement sur deux projets. Tout d'abord, le laboratoire pose l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses exploitent les interactions entre les nocicepteurs et le système immunitaire afin d'inhiber l'immunosurveillance, et d'améliorer ainsi la croissance et la survie de la tumeur. Aussi, une partie de mon stage a été dédiée à l'étude du profil d'expression des nocicepteurs lors d'une exposition à des cellules cancéreuses. Le second objectif de mon stage a été la mise en place et l'optimisation d'une méthode de mesure de l'activité électrique du nerf vague. Ce travail s'inscrit dans une étude dont le but est de déterminer les mécanismes par lesquels un antigène initie une réaction inflammatoire de type 2 dans les voies aériennes, et jusqu'à quel point les nocicepteurs sont impliqués.

MONTREAL • Canada

07/05/2018 → 07/09/2018



Direct activation of nociceptors in the context of type Th1 and Th2 immunity.

Nociceptors are a subset of peripheral sensory neurons, they share the ability of immune cells to sense exo and endogenous threats. The nervous and immune systems are generally thought of as two autonomous entities. However, numerous studies suggest that the two systems interact and cooperate. Nervous and immune cells communicate in a bidirectional and adaptive way, using the common language of cytokines and neuropeptides. Although this dialogue allows to coordinate appropriate defenses and protect organism from dangers, such interaction can become maladaptive and contributes to some pathologies. Thus, defining the mechanisms of the neuro-immune interplay by deciphering how and which sub-population of sensory neurons controls innate and adaptive responses could allow to develop new medical strategies. The current research of the Dr. Talbot's laboratory aim to understand the capacity of nociceptors to detect allergens, on the one hand, and their role in cancer immune surveillance, on the other. During this internship my work has consisted in two main projects. The laboratory hypothesize that cancer cells co-opt neuro-immune interplay to drive immune cell exhaustion, thereby sustaining tumor growth and survival. One part of my internship has then been dedicated to the study of nociceptor neurons expression profile when exposed to cancer cells. The second objective of my internship has been to set up and optimize a method of measure of the vagus nerve activity. This work contributes to a study which aim is to determine the specific mechanisms by which an antigen initiates airway type 2 inflammation, and at what point nociceptors are involved.



Chloé THIRY

3A-CPRO

PlantForm Corporation

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Doug COSSAR**

Extinction transcriptionnelle transitoire des gènes argonaute1 et argonaute4 afin d'augmenter l'expression de protéines recombinantes dans les plantes.

Plantform est une entreprise biopharmaceutique qui développe et produit des protéines hétérologues en utilisant leur plateforme vivoXPRESS. Les plantes sont infectées par *Agrobacterium tumefaciens* comportant l'ADN codant pour la protéine d'intérêt. Cet ADN est transmis aux cellules des plantes qui sont alors génétiquement modifiées pour produire des protéines thérapeutiques dans des serres contrôlées. Cependant, l'infection par *Agrobacterium* est considérée comme une menace par la plante qui mobilise un mécanisme de défense contre l'ADN entrant. L'ARNm transcrit à partir de cet ADN est dégradé en petits ARN interférents (ARNsi ou ARNm). Ceux-ci interagissent avec une machinerie complexe et suppriment la transcription du gène introduit dans la plante. La société développe alors sa propre méthode pour bloquer ce processus d'extinction de gène. De précédentes études ont démontré que 2 gènes, argonaute1 (AGO1) et argonaute4 (AGO4), codent pour des protéines clés intervenant dans ce mécanisme. Le but de ce projet est de trouver un moyen de supprimer l'activité de ces gènes afin d'augmenter l'expression d'une protéine hétérologue telle qu'un anticorps. L'approche expérimentale utilise de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) spécifiques d'une séquence d'un gène dont ils peuvent stopper l'expression. La première partie du projet se focalise sur la construction d'un vecteur contenant 3 différents shRNA ciblant des régions spécifiques des gènes AGO1 et AGO4. Le vecteur a été construit en utilisant une technique de clonage nouvelle génération appelée Gibson Seamless cloning permettant d'assembler de multiples fragments en une réaction d'une seule étape. La fonctionnalité du vecteur a été démontrée par dosage de la concentration en anticorps. De plus, AGO4 est connu pour intervenir dans le processus de méthylation de l'ADN, processus qui diminue fortement l'expression du gène introduit. Le but de la seconde partie du projet est de montrer si le statut de méthylation de la séquence d'un anticorps peut être réduit en utilisant des shRNAs qui suppriment l'activité d'AGO4. Le profil de méthylation de l'ADN est étudié en réalisant une conversion par bisulfite qui permet de différencier les cytosines méthylées des cytosines non méthylées. Une technique de séquençage nouvelle génération appelée Illumina MiSeq a été utilisée pour déterminer un profil de méthylation de l'ADN de l'anticorps exprimé dans des plantes infiltrées avec des shRNA ciblant les gènes AGO1 et AGO4.

GUELPH • Canada

07/05/2018 → 07/09/2018



Transient silencing of argonaute1 and argonaute4 to increase recombinant protein expression in plants.

PlantForm is a biopharmaceutical company focused on the rapid development and production of heterologous proteins using their proprietary vivoXPRESS platform. Plants are genetically manipulated by exposure to *Agrobacterium tumefaciens* carrying the genetic sequence for the target drug to produce biopharmaceuticals in a fully contained greenhouse environment. However, the *Agrobacterium* infection is recognised as a threat by the plant which mobilises a defense mechanism against this kind of invading DNA. mRNA transcribed from the foreign DNA is degraded into small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) which interact with a complex machinery to silence transcription of the 'invasive' gene. The company is developing its own method to block this silencing process. Previous studies have shown that 2 genes called argonaute1 (AGO1) and argonaute4 (AGO4) code for key proteins in the silencing complex. The aim of this project is to find a way to suppress the activity of these genes and consequently enhance expression of a heterologous protein such as an antibody. The experimental approach uses short hairpin RNAs (shRNAs) of specific sequence that can knock-down expression of the targeted gene. The first part of this project is to build a vector containing 3 different hairpins that target specific regions of the AGO1 and AGO4 genes. The vector is built using a new generation cloning technique called Gibson Seamless cloning that can assemble multiple fragments in a one-step reaction. Functionality of the vector is demonstrated by measurement of the concentration of an antibody. Furthermore, AGO4 is known to be involved in the process to methylate DNA which can shut down the expression of a foreign gene. The second aim of this project is to see if the methylation status of the antibody DNA sequence is reduced when using shRNAs that silence AGO4. The methylation profile of DNA is studied using a bisulfite conversion method that can discriminate methylated cytosines from unmethylated cytosines. Using a next generation sequencing technique called Illumina MiSeq, a methylation profile of the antibody DNA sequence has been created for plants infiltrated with different hairpins targeting AGO1 and AGO4.



Balladyne TRITSCH

3A-CPRO

CEVA SANTE ANIMALE

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Reynald MAGNIER**

Développement et validation d'un kit ELISA de détection de la prolactine porcine

Le laboratoire de bioanalyses de CEVA a pour missions principales le dosage de médicaments et la détection de toxines et de certaines hormones dans les milieux biologiques. Ces activités analytiques reposent sur des outils tels que la spectrométrie de masse et l'immunoanalyse. Dans le cadre du développement de la plateforme d'immunoanalyse, de nouveaux projets sont à l'étude, comme la quantification de la prolactine porcine, par immunodosage. Mon travail au cours de ce stage a porté sur l'évaluation des performances et la validation d'un kit commercial ELISA pour la détection de la prolactine porcine. Il s'agit d'un test ELISA « sandwich » où la concentration des échantillons à doser est estimée par rapport à une courbe d'étalonnage, correspondant au signal d'absorbance en fonction de la concentration en prolactine. La prolactine étant une hormone endogène, la difficulté principale réside alors dans l'utilisation d'un blanc le plus approprié pour les dosages. Premièrement une gamme standard fût réalisée dans un tampon fourni par le kit. L'objectif était alors de déterminer un facteur de dilution minimum applicable aux échantillons de sérum à doser, afin de limiter l'effet matrice observé. Deuxièmement cette même gamme standard fût réalisée dans du sérum porcin de mâle, dont la concentration en prolactine était significativement inférieure à celle retrouvée dans le sérum porcin de femelle. La limite de sensibilité dans le premier cas était de 0.313 ng/mL et de 1.25 ng/mL dans le second cas. Le test a présenté une répétabilité intra-run, et une répétabilité inter-run très satisfaisante, respectivement : CVintra = 9.5 % et CVinter = 19.72 %, au vu des critères définis par la guideline 2018 de validation de méthodes en bioanalyse, mis en place par l'agence européenne des médicaments. Cependant le kit a montré une grande variabilité dans la justesse des dosages.

LIBOURNE • France

14/05/2018 → 28/09/2018



Development and validation of porcine prolactin ELISA kit

The purpose of the bioanalytical laboratory of the RD department of CEVA is the detection of drug, toxin and several hormones in biological matrices, with mass spectrometry and immunoanalysis. News projects are carried out, as part of the development of the platform of immunoanalysis, like the quantification of porcine prolactin. The goal of my internship was to evaluate the performances and to validate one commercial ELISA kit for the quantification of porcine prolactin. It is an "sandwich" ELISA kit and the concentration of prolactin in the sample is calculated by comparing the OD of the sample to the standard curve. The prolactin is an endogenous hormone, that is why the main difficulty was to find the appropriate blank matrix for the dosage. Firstly, a standard range was made in a kit buffer. The objective was to identify a minimum required dilution factor applicable to test sample, in order to limit the observed matrix effect. Secondly, the same standard range was made in male pig serum, because the concentration of prolactin is lower than the concentration of prolactin in female pig serum. The minimum detectable level of prolactin in serum is 0.313 ng/mL, in the first case, and 1.25 ng/mL, in the second case. The precision intra-run and inter-run were acceptable with, respectively: CVintra = 9.5 % and CVinter = 19.72 %. However, the accuracy of this kit was out of the range of the acceptance criteria defined by the guideline 2018 on bioanalytical method validation of the European Medicine Agency.



Héloïse TUDELA

3A-Classique

Laboratoire Excell

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Sébastien PAILLARD**

Étude du catabolisme du 4-éthylphénol par *Pseudomonas* sp. et développement d'une méthode de décontamination des vins

Durant la vinification, et plus particulièrement la fermentation, les micro-organismes jouent un rôle prépondérant dans le développement des arômes en consommant les sucres présents dans le jus de raisin. Cependant, certains de ces micro-organismes, comme la levure *Brettanomyces bruxellensis*, produisent des composés organoleptiques tels que le 4-éthylphénol qui induisent une odeur de cuir ou d'écurie dès de très faibles concentrations — de l'ordre de 430 µg/L. Ce micro-organisme intervient à la fin de l'étape de fermentation et peut se développer dans des jus possédant de faibles concentrations en sucres. Afin d'éviter la production de ces composés, le sulfitage est couramment répandu dans l'industrie viti-vinicole. Ce procédé d'addition de dioxyde de soufre permet de ralentir la croissance des micro-organismes indésirables. Il présente néanmoins plusieurs inconvénients, dont celui de ne pas être efficace contre certaines souches se trouvant résistantes au sulfitage. Il peut également provoquer des allergies chez certaines personnes dites hypersensibles.

Cependant, lorsque le 4-éthylphénol est produit, il n'existe que peu de méthodes pour l'éliminer du vin. Une décontamination grâce à des filtres à charbon est proposée par certaines sociétés, mais cette méthode peut modifier également la qualité des vins en altérant leur composition en composés aromatiques.

Afin de lutter contre la présence de ce composé, il m'a été demandé de développer un procédé de décontamination des vins à l'aide d'une enzyme, dégradant le 4-éthylphénol. L'enzyme, produite par une bactérie, est extraite puis encapsulée afin de décontaminer des solutions présentant des concentrations élevées de 4-éthylphénol. Il m'a été possible, par des analyses chromatographiques, de montrer que le micro-organisme possédait la capacité de consommer le 4-éthylphénol ainsi que d'extraire cette activité. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer la dégradation du 4-éthylphénol par l'enzyme encapsulée et de déterminer la nature et l'impact organoleptique du produit de dégradation qui en est issue.

MERIGNAC • France

14/05/2018 → 28/09/2018



Catabolism of 4-ethylphenol by *Pseudomonas* sp. and development of wines decontamination way

During the manufacturing of wines, and more particularly the fermentation, the microorganisms play a leading role in the development of the aromas by consuming present sugars in the grape juice. However, some of these microorganisms, as the yeast *Brettanomyces bruxellensis*, produce organoleptic compounds such as the 4-ethylphenol, which cause a smell of leather or stable at very low concentrations — from 430 µg/L. This microorganism intervenes at the end of fermentation and can grow in juices possessing low concentrations in sugars. To avoid the production of these compounds, sulphiting is commonly used in the wine-producing industry. The addition of sulphur dioxide allows to slow down the growth of the unwanted microorganisms. Nevertheless, it has several drawbacks, one of them being not being effective against some strains that are resistant to sulphiting. It can also provoke allergies for some hypersensitive people.

However, when the 4-ethylphenol is produced, there are only few methods to decontaminate wines. A decontamination thanks to coal-based filters is proposed by a few companies, but this method can also modify the quality of wines by altering their composition in aromatic compounds.

In order to fight against the presence of this compound, I was asked to develop a process of decontamination of wines by using an enzyme, degrading the 4-ethylphenol. The enzyme, produced by a bacteria, is extracted and encapsulated to decontaminate solutions presenting high concentrations of 4-ethylphenol. Thanks to chromatographic analyses, I was able to show that the microorganism possessed the capacity to consume the 4-ethylphenol as well as to extract this activity. Additional analyses are necessary to confirm the degradation of the 4-ethylphenol by the encapsulated enzyme and to determine the nature and the organoleptic impact of the degradation product.



Andréa VAUDRAN

3A-CPRO

SANOFI-AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Oliver BROOM**

Étude du rôle de HOTAIR en interaction avec les récepteurs aux hormones stéroïdes dans le cancer du sein triple négatif

Le cancer du sein triple négatif (ou TNBC) représente 12 à 24 % en moyenne des formes du cancer du sein diagnostiquées avec une survie médiane des patients atteints variant de 12 à 18 mois. Il est nommé ainsi du fait de l'absence des récepteurs aux hormones stéroïdes (SHR) que sont le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains (HER2). Pour ce sous-groupe, il n'y a actuellement aucune thérapie ciblée disponible et approuvée par la FDA et l'EMA. La recherche de nouvelles cibles est indispensable. Par exemple, HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic lncRNA), un long ARN non codant, a été identifié comme étant surexprimé dans le cancer du sein. Il semble jouer un rôle important dans la progression tumorale via la régulation des gènes et le remodelage de l'état de la chromatine. Par ailleurs, la littérature décrit des interactions entre HOTAIR et des SHR tels que l'ER et le récepteur aux androgènes (AR) dans le cancer de sein et de la prostate respectivement. Un autre membre de la famille des SHR, le récepteur aux glucocorticoïdes serait lui aussi impliqué dans les phénomènes de résistance à la chimiothérapie et de récurrence des TNBC en cas de forte expression. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle de HOTAIR en interaction avec l'AR et le GR dans le TNBC. Pour cela, il a fallu vérifier l'expression des molécules d'intérêt par qPCR, ddPCR™ et Western Blot dans les lignées cellulaires issues de TNBC choisies à savoir CAL-148 et MDA-MB-231. Les stratégies de transfection des cellules par ARN interférents et par des plasmides d'ADN exprimant HOTAIR ont été utilisées pour réduire l'expression des molécules d'intérêt et augmenter l'expression du lncARN HOTAIR afin d'étudier les conséquences sur la prolifération cellulaire. L'ensemble des expériences a montré que HOTAIR, AR et GR sont exprimés dans les CAL-148, à l'inverse des MDA-MB-231 qui n'expriment que GR. De plus, la faible réduction de l'expression de HOTAIR obtenue a abouti à une diminution de la prolifération cellulaire. A l'inverse, une diminution de l'expression de AR a abouti à une légère augmentation de la prolifération cellulaire. Malheureusement, il n'a pas été possible de statuer sur l'effet d'une surexpression de HOTAIR sur la prolifération cellulaire du fait de la toxicité supposée du plasmide pour les cellules.

STRASBOURG • France

02/05/2018—28/09/2018



Study of the role of HOTAIR interacting with steroid hormone receptors in triple negative breast cancer

Triple-negative breast cancer (or TNBC) accounts for an average of 12 to 24% of breast cancer forms diagnosed, with a median survival of patients ranging from 12 to 18 months. It is so called because of the absence of the steroid hormone receptors (SHRs) that are the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR) and the human epidermal growth factor receptor (HER2). For this subgroup, there is currently no targeted therapy available and approved to date by the FDA and EMA. The search for new targets is essential. For example, HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic lncRNA), a long non-coding RNA, has been identified as overexpressed in breast cancer. It appears to play an important role in tumor progression via gene regulation and chromatin remodeling. In addition, the literature describes interactions between HOTAIR and SHRs such as ER and the androgen receptor (AR) in breast and prostate cancer respectively. Another member of the SHR family, the glucocorticoid receptor (GR), would also be involved in the phenomena of resistance to chemotherapy and recurrence of TNBC in case of high expression. The objective of this project is to study the role of HOTAIR in interaction with AR and GR in TNBC. For this, it was necessary to verify the expression of the molecules of interest by qPCR, ddPCR™ and Western Blot in the selected TNBC cell lines namely CAL-148 and MDA-MB-231. Interfering RNA cell transfection strategies and HOTAIR-expressing DNA plasmids were used to reduce the expression of the molecules of interest and increase the expression of the HOTAIR lncARN in order to study the consequences on cell proliferation. All experiments showed that HOTAIR, AR and GR are expressed in CAL-148, unlike MDA-MB-231 which express only GR. In addition, the small reduction in HOTAIR expression obtained resulted in a decrease in cell proliferation. Conversely, a decrease in AR expression resulted in a slight increase in cell proliferation. Unfortunately, it was not possible to rule on the effect of HOTAIR overexpression on cell proliferation because of the supposed toxicity of the plasmid to the cells.



Loris VERRON

3A-Classique

UMR 7276 CNRS - INSERM U1262 - UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Maître(s) de stage / Supervisor(s): **Sandrine LE NOIR**

Influence des régions régulatrices Eμ et 3'RR du locus chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) sur le maintien de l'organisation du génome du lymphocyte B

La réponse immunitaire spécifique repose sur les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces derniers, produisent des anticorps (ou immunoglobulines solubles) spécifiques des antigènes rencontrés. Nous nous intéressons au locus chaîne lourde d'immunoglobulines (IgH), composé d'une région variable VDJ et de régions régulatrices. Ce gène est soumis à de nombreux remaniements génétiques lors de la maturation des lymphocytes B. Les deux grands mécanismes sont : l'Hypermutation Somatique (SHM) qui induit des mutations ponctuelles augmentant l'affinité pour l'antigène et les Recombinaisons de Classe (CSR) permettant le passage à IgG par exemple. Ils sont hautement contrôlés afin d'éviter les recombinaisons dangereuses pour la cellule telles que des translocations pouvant induire la survenue des lymphomes. Ces remaniements sont sous le contrôle de régions régulatrices présentes sur le locus IgH il s'agit des régions Eμ et 3'RR. Au cours de mon stage, j'ai étudié le rôle de ces régions régulatrices sur l'intégrité du génome du lymphocyte B en utilisant différents modèles murins présentant une absence totale ou partielle de ces régions régulatrices. J'ai étudié les recombinaisons légitimes (CSR) et illégitimes (translocations) ainsi que les interactions physiques entre différents loci du génome grâce aux techniques de Circularized Chromosome Capture Conformation (4C) et de Linear Amplification-Mediated High-Throughput Genome-wide Translocation Sequencing (LAM-HTGTS).

LIMOGES • France

14/05/2018—31/08/2018



Influence of the Eμ and 3'RR regulatory regions of the heavy chain immunoglobulin locus (IgH) on the conservation of the B lymphocyte genome organisation.

The specific immune response is based on T and B lymphocyte activities. B lymphocytes produce antibodies (or soluble immunoglobulins) specific to encountered antigens. We studied the immunoglobulin heavy chain locus (IgH), which is composed of a variable VDJ region and regulatory regions. This gene is modified by several genetic rearrangements during B lymphocyte maturation. The two major mechanisms are : Somatic Hypermutation (SHM), which increases the affinity for the antigen by punctual mutations, and Class Switch Recombination (CSR), resulting in the production of IgG for example. They are highly controlled to avoid any dangerous recombinations such as translocations which can induce the development of lymphomas. These mechanisms are controlled by regulatory regions such as Eμ and 3'RR located in the IgH locus. During this internship I studied the integrity of the B lymphocyte genome in different mouse models, defined by the total or partial deletion, of the regulatory regions. I analysed the legitimate recombinations (CSR) and the illegitimate ones (translocations), as well as the physical interactions between several parts of the genome. For that I used the Circularized Chromosome Capture Conformation and Linear Amplification-Mediated High-Throughput Genome-wide Translocation Sequencing techniques.



Charlotte VION

3A-CBI

LALLEMAND BIOFUELS AND DISTILLED SPIRITS

Maître(s) de stage / Supervisor(s): Luis ORTEGA

Développement, à l'échelle laboratoire, de souches de levures présentant un intérêt pour l'industrie des Biocarburants et des Spiritueux.

L'une des missions principales du laboratoire R&D du LBDS est d'évaluer le potentiel de production de différentes souches de levures ayant des capacités de fermentation avantageuses telles qu'un fort rendement en éthanol, un taux de conversion du sucre en éthanol élevé ou encore un caractère alcoolique intéressant (saveur, parfum ou odeur, sensation en bouche, etc.). Certaines de ces souches sont ensuite produites à grande échelle pour être commercialisées dans l'industrie des biocarburants ou des spiritueux. L'objectif est de développer des souches ayant la capacité de s'adapter à une plateforme de production commune à la plupart des usines de Lallemand. Durant ce stage, j'ai été amenée à travailler sur des projets de développement de souches en utilisant une nouvelle souche presque chaque semaine. Cela m'a permis de réaliser l'ensemble des tests pratiqués sur les levures lors d'un projet en particulier, incluant des cultures en batch et en fed-batch à l'échelle laboratoire, dans un bioréacteur ayant un volume utile de 20L, ainsi le conditionnement des levures sous forme liquide ou séchée afin d'évaluer ses capacités de fermentation et éventuellement les rendre disponibles pour des procédures de tests propres aux clients. Ces fermentations en bioréacteurs ont pour but de vérifier que la souche testée s'accommode bien au substrat et aux conditions industrielles. Des échantillons des levures produites en bioréacteurs sont ensuite testés via des fermentations en flasques, dans des conditions particulières, afin de quantifier leur vitesse de production et le rendement en éthanol ainsi que la consommation de substrat (amidon, sucrose, glucose, fructose, et/ou xylose ou arabinose). Des échantillons de ces cultures sont analysés par chromatographie HPLC.

MONTREAL • Canada

07/05/2018—>30/08/2018



Development, at laboratory scale, of yeasts strains with relevance for the industry of Biofuels and Distilled Spirits.

One of the main missions of LBDS' R&D-laboratory is to evaluate the production potential of different yeast strains with advantageous fermentation capabilities such as high ethanol yield, high sugar-to-ethanol conversion rates and interesting alcohol character (flavor, fragrance or odor, mouthfeel, etc.). Some of these strains are then produced on a large scale facility for commercialization in either the biofuels or distilled spirits industries. The goal is to develop strains that can accommodate a production platform that is common for most Lallemand production facilities. During this internship, I had the opportunity to work on strain development projects that introduced a new strain almost in a weekly basis. This allowed me to perform all the tests usually carried out on particular projects, that included batch and fed-batch cultures at the laboratory scale, in a bioreactor with a working volume of 20L, as well as manufacturing of yeast samples in liquid or dried formats in order to evaluate its fermentation capabilities and eventually to make them available for the client's own testing procedure. These propagations in bioreactors are intended to verify that the tested strains are capable to adapt to the substrate and industrial conditions. Yeast samples produced in the bioreactors are then evaluated in flasks fermentations, under particular conditions in order to quantify the speed and yield of ethanol and the profile of substrate consumed (starch, sucrose, glucose, fructose, and/or xylose or arabinose). Samples of these fermentations are analyzed by HPLC.