



PLANNING & RÉSUMÉS

**Stage de 2^{ème} ANNÉE
Année 2018-2019**

13- 14 novembre 2019

**52 INGENIEURS ENSTBB
PROMOTION 2020**

SCHEDULE & ABSTRACTS

***2nd YEAR INTERNSHIPS
Year 2018-2019***

November 13-14, 2019

***52 ENSTBB ENGINEERS
CLASS OF 2020***



IRLANDE / IRELAND

- SCHOOL OF BIOCHEMISTRY AND IMMUNOLOGY (Dublin)



ROYAUME-UNI / UNITED KINGDOM

- CANCER RESEARCH UK Manchester Institute (Manchester)
- FANTO LAB (Londres)
- OXFORD BROOKES UNIVERSITY (Oxford)
- IMMUNOCORE UK (Oxfordshire)
- IMPERIAL COLLEGE LONDON (London)
- LONZA BIOLOGICS plc (Cambridge)
- THE OPEN UNIVERSITY (Milton Keynes)
- UCB (Slough)
- UNIVERSITY COLLEGE LONDON (Londres)
- UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE (Hatfield)
- UNIVERSITY OF LIVERPOOL (Liverpool)
- UNIVERSITY of Westminster, Science and Technology (Londres)



FRANCE / FRANCE

- AMAbiotics (Paris)
- COVALX ANALYTICS (Bordeaux)
- ID.VET (Graveles)
- IFREMER (Nantes)
- INOTREM (Vandoeuvre les Nancy)
- INSERM DR Paca et Corse (Marseille)
- INSERM U 1053 (Bordeaux)
- INSERM UMR 1043 (Toulouse)
- IRBA (Brétigny sur Orge)
- IECB (Pessac)
- LAFFORT (Floirac)
- LFB Biomanufacturing (Alès)
- Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale – PTIB (Pessac)
- DOM TOM
- PACIFIC BIOTECH (Arue - Polynésie Française)



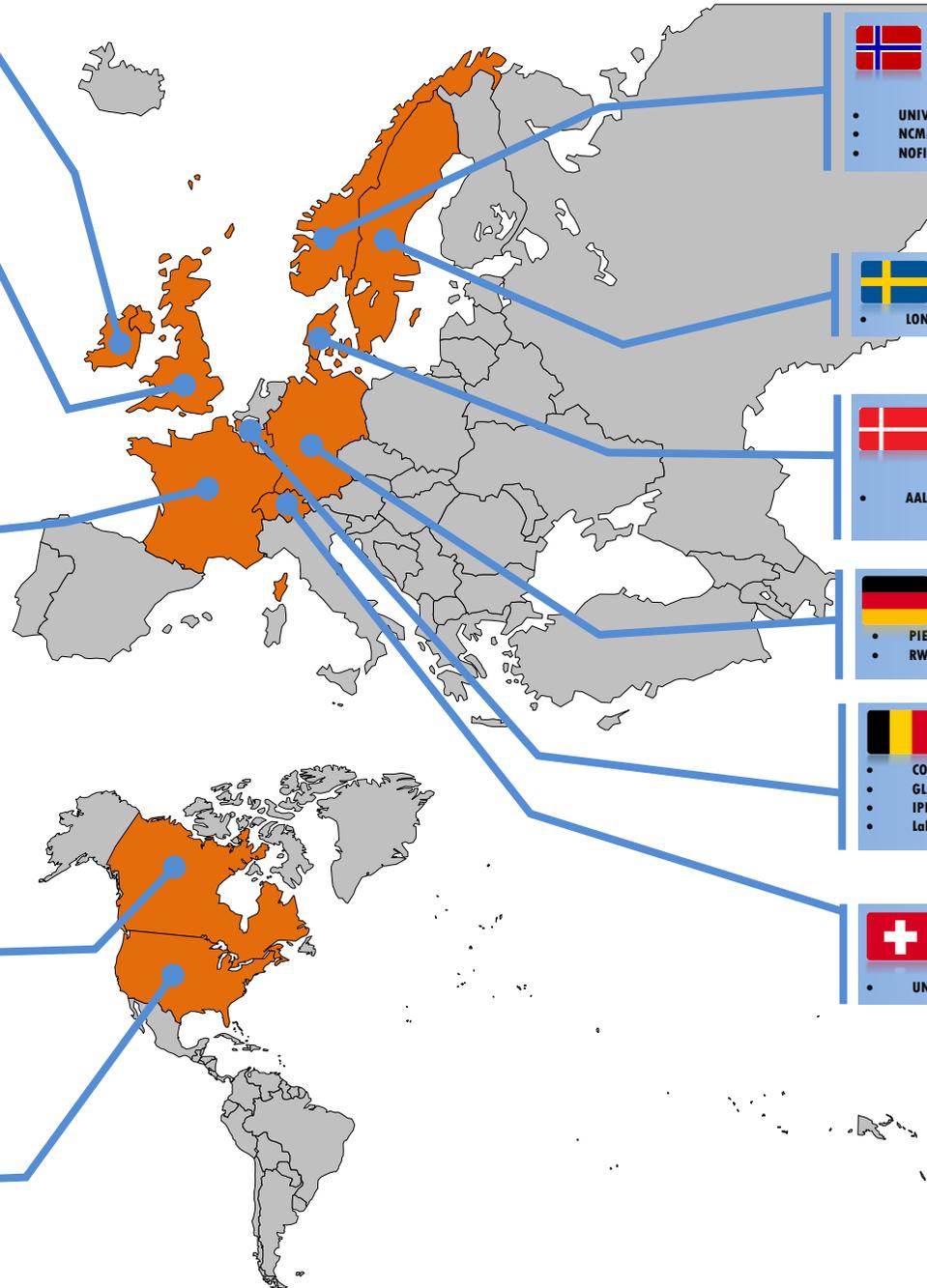
CANADA / CANADA

- INRS-IAF (Laval)
- LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS (Montréal)
- NUVAAC INC.(Valcourt)
- PLANTFORM CORPORATION (Guelph)
- TALBOT LABS (Montréal)



ETATS-UNIS / UNITED STATES

- INVETECH (San Diego)
- ARBOR VITA Corporation (Frémont)
- NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (Raleigh)



NORVEGE / NORWAY

- UNIVERSITY of BERGEN (Bergen)
- NCMM - Centre for Molecular Medicine Norway (Oslo)
- NOFIMA (Tromsø)



SUEDE / SWEDEN

- LONGBOAT EXPLORERS (Lund)



DANEMARK / DENMARK

- AALBORG University (AALBORG)



ALLEMAGNE / GERMANY

- PIERIS PHARMACEUTICALS GmbH (Freising)
- RWTH Aachen University (Aachen)



BELGIQUE / BELGIUM

- CONFO THERAPEUTICS (Gant)
- GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS (Wavre)
- IPRATECH S.A. (Mons)
- Laboratoire URBE (Namur)



SUISSE / SWITZERLAND

- UNIVERSITÉ DE GENÈVE (Genève)



Astrid ASSER

AMAbiotics

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Xavier MANIÈRE**

Développement des outils de gestion dans une société de biotechnologie.

Amabiotics est une société de biotechnologie qui travaille sur un candidat médicament contre la maladie de Parkinson. Depuis ces dernières années, l'entreprise a bien évolué et a pu faire une preuve de concept in vitro. De ce fait Amabiotics est passé d'une société de recherche à une société de développement, elle s'est agrandie et son effectif est passé de deux personnes à maintenant huit en quelques années. De plus Amabiotics a maintenant une branche aux États Unis, cette augmentation de l'effectif et cette double localisation nécessite une communication et une gestion plus formelle. L'objectif est donc d'adapter les outils de gestion de l'entreprise à son évolution. Pour cela plusieurs aspects ont été travaillé comme l'organisation des connaissances, la gestion financière, l'administration des projets et le côté juridique. Dans chacun des cas, il a fallu établir les objectifs de l'entreprise, puis identifier et sélectionner les outils adéquats et enfin les mettre en place. Ces actions ont ensuite été évaluées, et améliorées selon un processus itératif.

PARIS • France

03/06/2019 → 27/09/2019



Development of management tools in a biotechnological company.

Amabiotics is a biotechnological's society which is working on a drug candidate which can treat Parkinson's disease. In recent years, the company has evolved thanks to a proof of concept on an in vitro model. Thanks to this, Amabiotics went from a research company to a development company and the number of employees went from two persons to eight. What's more, Amabiotics has now a branch at the United States of America, this increase of the headcount and this double localization requires a communication and a more formal management. The objective is to adapt management's tools of the company to its evolution. In order to achieve these goals, several aspects have been worked, knowledge's organization, financial management, project administration and the legal facet. In every case, the objectives have been established, afterwards identify and select adequate tools and then set up them. Once these actions have been put in place, they are evaluated and improve according an iterative process.



Morgane BAILLEUL

PIERIS PHARMACEUTICALS GmbH

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Thibaut ANGEVIN**

Etablissement d'une plate-forme CHO à expression transitoire à haut débit pour l'évaluation de la développabilité d'anticorps bispécifiques.

Pieris Pharmaceuticals est une entreprise de biotechnologie spécialisée en immuno-oncologie et maladies respiratoires. Ses molécules brevetées, les Anticalins™, sont de petites molécules thérapeutiques dérivées des lipocalines humaines. Pieris Pharmaceuticals possède actuellement une bibliothèque de plus de 100 milliards d'Anticalins™. Ces Anticalins™ peuvent être fusionnées à un anticorps, lui conférant une bispécificité, et ces molécules sont appelées "molécules bispécifiques de fusion". La fusion peut se faire dans différentes orientations, donnant lieu à un grand nombre de constructions possibles, chacune présentant un profil de développabilité distinct. Une telle quantité de constructions ne peut pas être évaluée par le débit standard d'un laboratoire. Le but de mon stage au sein de l'équipe de Développement de Lignées Cellulaires était d'établir une plateforme à haut débit en CHO pour évaluer l'expression des différentes molécules. Le projet a été divisé en trois parties : premièrement, le système actuel d'expression transitoire en cellules mammifères devait être adapté à une plateforme à haut débit en plaques 96 puits profonds et les paramètres de culture, de transfection et de purification devaient être déterminés ; ensuite, cette plateforme devait être optimisée pour obtenir des titres plus élevés et devait être intégrée dans un processus de production allant de la culture cellulaire au produit purifié ; enfin, la performance de la plateforme finale fut évaluée par une étude de cas avec 48 différentes constructions.

FREISING • Allemagne

03/06/2019 → 30/08/2019



Establishment of a high-throughput CHO transient expression platform for developability assessment of bispecific fusion molecules.

Pieris Pharmaceuticals is a biotechnology company focusing on immuno-oncology and respiratory diseases. Its proprietary molecules, the Anticalins™, are small therapeutics derived from human lipocalins. Pieris Pharmaceuticals currently owns a library of more than 100 billion of different Anticalins™. These Anticalins™ can be fused to an antibody, conferring it bispecificity, and such molecules are therefore referred to as "bispecific fusion molecules". The fusion can be done in various orientations, giving rise to a huge number of possible constructs, each displaying a distinct developability profile. Such a vast quantity of constructs cannot be evaluated by standard laboratory throughput. The aim of my internship within the Cell Line Development team was to establish a high-throughput platform in CHO to support Pieris's developability assessment initiative. The project was divided into three parts: Firstly, the current mammalian transient expression system had to be adapted to a high-throughput platform in 96 deep-well plate and parameters of culture, transfection and purification had to be determined; then, this platform had to be optimized to get higher titers and had to be integrated into a workflow from cell culture to purified product; Finally, the performance of the finalized platform was evaluated through a case study with 48 different molecular constructs.



Naelle BARABE

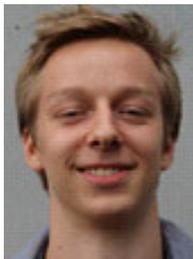
Caractérisation du patronne d'expression des gènes du système nerveux dans les organes céphaliques du vers marin *Lineus ruber*.

La recherche au sein du Centre International Sars de la Biologie Moléculaire Marine se focalise sur l'étude d'animaux marins afin d'étudier le développement des organes et systèmes dans un contexte d'évolution. Le Centre Sars est formé de huit groupes de recherche, dont le groupe du Dr. Andreas Hejnol dans lequel j'ai réalisé mon stage. Le groupe Hejnol étudie une large gamme d'animaux marins afin de mieux comprendre l'évolution et le développement des organes et systèmes animaux par des approches comparatives et l'utilisation d'outils génomiques et de techniques moléculaires modernes. Durant mon stage, je me suis focalisée sur les organes céphaliques du Némertien *Lineus ruber*. Ces organes sont supposés jouer un rôle dans la chemoréception, mais il n'est pas à exclure qu'ils pourraient avoir d'autres rôles. De plus, il est présumé qu'ils correspondent aux corps pédonculés des Arthropodes, qui sont impliqués dans des processus sensoriels et d'apprentissage. Les organes céphaliques sont composés de cellules neuronales et de cellules glandulaires. Ils possèdent aussi un canal céphalique qui connecte les organes à l'extérieur. L'objectif de ce projet est de caractériser le patronne d'expression de gènes neuronaux dans les organes céphaliques par hybridations in situ fluorescentes (FISH). Les résultats montrent que pour tous les gènes, les patronnes d'expression se situent dans la partie antérieure des organes céphaliques, très proche du cerveau et/ou des neurites. De plus, connaissant les fonctions de tous les gènes candidats chez les Arthropodes, il est possible de supposer que le système nerveux de *Lineus ruber* est toujours en développement à 60 jours, et que les organes céphaliques pourraient avoir un rôle dans la mémoire et l'apprentissage. Cependant, les outils moléculaires (ARNi, CRISPR-Cas9) qui pourraient permettre de connaître les fonctions de ces gènes ne sont pas disponibles pour *Lineus ruber*. Pour de futures études, des doubles hybridations in situ devraient être réalisées afin de savoir si certains gènes sont co-exprimés dans les mêmes cellules. De plus, il est nécessaire de caractériser l'expression de plus de gènes candidats impliqués dans la mémoire et l'apprentissage, en se concentrant sur lesquels sont exprimés ou non dans les organes céphaliques de *Lineus ruber*.



Characterization of nervous system genes' expression pattern in the cephalic organs of the marine worm *Lineus ruber*.

Research at the Sars International Centre for Marine Molecular Biology focuses on the study of marine animals to investigate the development of organs and systems in an evolutionary context. The Sars Centre is formed by eight research groups, including Dr. Andreas Hejnol group, in which I have done my internship. Hejnol's group studies a wide range of marine animals to better understand the evolution and development of animal organs and systems through comparative approaches, genomic tools and modern molecular techniques. During my internship, I focused on the study of the cephalic organs of the Nemeritean *Lineus ruber*. These organs are suspected to play a role in chemosensory, but other roles should not be discarded. Furthermore, they are thought to correspond to the arthropod mushroom bodies, which are involved in sensory and learning processes. The cephalic organs are composed of neuronal and glandular cells. They also have a cephalic canal that connects the organ to the exterior. The aim of this project is to characterize the expression pattern of neuronal genes in the cephalic organs by means of fluorescent in situ hybridization (FISH). The results indicate that for all the genes, expression is found in the anterior part of the cephalic organs, very close to the brain and/or the neurites. Moreover, knowing the roles of all the candidate genes in arthropods, it can be supposed that the nervous system of *Lineus ruber* is still in development at 60 days, and that the cephalic organs could have a role in memory and learning processes. However, molecular tools (e.g. RNAi, CRISPR-Cas) that could allow to know the functions of these genes are not available for *Lineus ruber*. For future studies, double in situ hybridizations should be performed in order to know if some genes are co-expressed in the same cells. Furthermore, it is necessary to characterize the expression of more candidate genes involved in memory and learning, focusing on whether or not they are expressed in the cephalic organs of *Lineus ruber*.



Ronan BESSARD

Étudier la contribution des divergences morphologiques des organes génitaux masculin entre *Drosophila mauritiana* et *Drosophila simulans* sur le comportement reproducteur et l'isolation reproductrice.

Les structures génitales masculines sont parmi les caractéristiques morphologiques qui évoluent le plus rapidement chez les espèces à fertilisation interne. Ce processus serait guidé par la sélection sexuelle et renforcerait la séparation des espèces. Les deux espèces de drosophiles *Drosophila simulans* et *Drosophila mauritiana* ont divergées l'une de l'autre il y a environ 240 000 ans. Les seules différences morphologiques observées sont situées au niveau des parties génitales masculines. Parmi ces parties génitales le clasper (ou surstyli), une partie secondaire des mâles chez les insectes qui joue un rôle important dans la reproduction, sont plus large et possède plus de soies mécano-réceptrice. Précédemment, des études génétiques ont trouvé que le gène *tartan* (*trn*), situé sur le chromosome 3 des deux espèces, contribue à 16% des différences morphologiques des claspers entre les deux espèces. Lors de ce stage, mon rôle a essentiellement porté sur deux projets.

Le premier a été de mettre en œuvre des expériences de fertilisation compétitive entre deux types de mâles dont le génome ne différait que par la version du gène *tartan* induisant ainsi une différence dans la morphologie des claspers. Nous avons également comparé la fréquence de copulation, la latence et la durée, ainsi que le nombre total de descendants produit par ces mâles. Nous avons trouvé des différences pour la durée et la fréquence de l'accouplement entre les mâles possédant des claspers proche de *D. simulans* et ceux possédant de *D. mauritiana*, mais nous n'avons trouvé aucune différence lors de la fécondation compétitive. Ceci suggère que la variation chez les mâles affecte le succès de la reproduction lors de la sélection pré-copulatoire.

Le second projet visait à modifier génétiquement des drosophiles afin de déterminer si une divergence génétique chez *sneaky* (*snky*), un gène immédiatement voisin de *tartan*, induisait une divergence fonctionnelle dans la fécondation entre *D. mauritiana* et *D. simulans*. Par conséquent, nous avons conçu une expérience de knock-out par CRISPR / Cas9 en insérant le marqueur DsRed dans le cadre de lecture de *snky*. Cette opération aurait été produite chez *D. simulans* et dans une lignée identique sauf au niveau de *snky* ou elle exprimerait la version *D. mauritiana* de *snky*. Nous avons pu reséquencer la région entourant la cible génétique de chacune des souches parentales, qui sont maintenant prêtes pour le clonage dans le vecteur pH-DsRed-attP. L'étape suivante sera d'injecter ce vecteur ainsi que les ARNg injecté dans les souches parentales, qui possèdent une protéine Cas9 endogène exprimée dans la lignée germinale. Les mouches mutantes seront ensuite criblées pour le marqueur DsRed et croisées avec la lignée parentale réciproque pour générer des hémizygotes réciproques et comparer leurs performances de reproduction.



Investigate the contribution of morphological divergence in male genitalia between *Drosophila mauritiana* and *Drosophila simulans* to mating behaviour and reproductive isolation.

Male genitalia of internally fertilizing taxa are among the most rapidly evolving morphological traits. This process is thought to be driven by sexual selection and may reinforce the separation of species. *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana* diverged from one another approximately 240 000 years ago but already exhibit striking differences in the morphology of the male genitalia. Among these genital structures, the claspers (*surstyli*), which are peripheral structures with an important role in copulation in insects, are larger and have more mechanosensory bristles in *D. mauritiana* than *D. simulans*. Previously, the host lab found that genetic divergence in *tartan* (*trn*) contributes to about 16% of the difference in clasper size between these two species. Here, we used competitive assays to compare the fertilisation success of males whose genome differed only in the species-identity of the *trn* allele they carried and therefore that differed also in the size of the claspers. We also compared copulation frequency, latency and duration as well as total number of progeny between these males. We found differences in copulation duration and frequency between males carrying *D. simulans* claspers and those carrying *D. mauritiana*'s but found no difference in competitive fertilization. This suggests that variation in male claspers affects reproductive success on precopulatory selection.

Another project aimed to develop the reagents necessary to investigate if genetic divergence in *sneaky* (*snky*), a gene immediately neighbouring *tartan*, underlies functional divergence in sperm function between *D. mauritiana* and *D. simulans*. Therefore, we designed a CRISPR/Cas9 experiment to knockout *snky* and simultaneously knock-in the DsRed marker, via homology-directed repair, in *D. simulans* and in an introgression line that includes *D. mauritiana snky* in a pure *D. simulans* background. We were able to re-sequence the homology arms from each of the parental strains, which are now ready for cloning into the pH-DsRed-attP vector. This will then be injected into the parental strains, which carry an endogenous Cas9 expressed in the germline, together with the gRNAs. Mutant flies will then be screened for the DsRed marker and crossed to the reciprocal parental line to generate reciprocal hemizygotes and compare their reproductive output.



Julie BLANCO

Intégration de la séquence pUltra dans le génome d'Escherichia coli C321.ΔA.exp par CRISPR/Cas9 afin d'améliorer l'efficacité et la fidélité d'incorporation d'acides aminés non protéinogènes.

Le projet consistait à intégrer la séquence pUltra dans le génome d'Escherichia coli C321.ΔA.exp via CRISPR/Cas9 afin de créer une nouvelle souche capable d'améliorer l'efficacité et la fidélité d'incorporation d'acides aminés non protéinogènes (aap). Cette séquence code pour le couple aminoacyl-ARNt orthogonal/ARNt synthétase incorporant les aap aux codons stop UAG introduits dans le gène d'intérêt. Chaque composants requis pour l'édition du génome : l'ADN double brin incluant la séquence pUltra à insérer, l'ARN guide codé par le plasmide pGRB1 et le plasmide pREDCas9-SacB codant pour la protéine Cas9, les recombinaisons et un plasmide de guérison basé sur l'expression du gène sacB ; ont été construits via diverses techniques de biologie moléculaire comme la PCR, la digestion par enzymes de restriction, la ligature de fragments d'ADN, l'OE-PCR et le Golden Gate cloning. Malheureusement, par manque de temps, cette nouvelle souche n'a pas pu être obtenue et il n'a donc pas été possible de la comparer à un système d'incorporation exprimant le plasmide pUltra. Néanmoins, l'efficacité et la fidélité d'incorporation d'aap ont pu être évaluées par deux autres systèmes : différentes formes du plasmide sfGFP-pBAD ont été co-exprimées avec le plasmide pUltra dans E. coli C321.ΔA.exp ainsi qu'avec le plasmide pEvol-pAzFRS.2.t1 dans E. coli BL21. Les différentes formes de la sfGFP à avoir été testées sont la sfGFP de type sauvage et la sfGFP avec un (simple mutant) ou deux (double mutant) codons stop UAG introduits à la place d'une ou deux lysines. L'efficacité d'incorporation d'aap, définie comme la rapidité de lecture du nouveau codon par le ribosome, a été évaluée par dosage fluorimétrique et par SDS-PAGE tandis que la fidélité, représentant la précision avec laquelle le ribosome est capable de lire le nouveau codon comme étant un aap, a été mesurée en utilisant la spectrométrie de masse. Le plasmide pUltra a démontré être capable d'incorporer une ou deux para-Azido-L-phenylalanine (pAzf) avec une fidélité de 95% et 93% respectivement pour le simple et le double mutant. De plus, l'efficacité d'incorporation diminuait, comme attendu, avec le nombre de pAzf incorporées, passant de 50% à 10% respectivement pour le simple et le double mutant. A l'inverse, pEvol-pAzFRS.2.t1 n'a introduit aucune pAzf dans les mutants de la sfGFP et a produit environ trois fois moins de sfGFP pour le type sauvage.



Genomic integration of the pUltra sequence in Escherichia coli C321.ΔA.exp using CRISPR/Cas9 for enhancing non-canonical amino acid incorporation efficiency and fidelity.

The project was to integrate the pUltra sequence — encoding for the orthogonal aminoacyl-tRNA/tRNA synthetase pair that incorporates non-canonical amino acids (ncAA) at designated amber stop codons introduced to the gene of interest — into Escherichia coli C321.ΔA.exp using CRISPR-Cas9 technology in order to create a new platform strain enhancing ncAA incorporation efficiency and fidelity. Each component required for genome editing — the donor dsDNA including the pUltra sequence, the gRNA encoded by the pGRB1 plasmid and the pREDCas9-SacB plasmid encoding cas9, recombination genes and a sacB-based plasmid curing system — were constructed using various molecular biology techniques such as PCR-amplification, restriction enzyme digestion, DNA ligation, overlap-extension PCR and Golden Gate cloning. Unfortunately, due to a lack of time, the new genomically-integrated platform strain was not obtained and could not be compared to the plasmid-based pUltra incorporation system. Nevertheless, the ncAA incorporation efficiency and fidelity of two plasmid-based systems were still evaluated: sfGFP-pBAD variants co-expressed either with pUltra in E. coli C321.ΔA.exp or with pEvol-pAzFRS.2.t1 in E. coli BL21. The sfGFP-pBAD variants tested were wild-type sfGFP and sfGFP with either one (single mutant) or two (double mutant) amber stop codons introduced at lysine residues. ncAA incorporation efficiency — representing the reading speed of the ribosome for the reassigned codon — was evaluated via a fluorimetric assay and SDS-PAGE analysis whereas the fidelity — depicting the accuracy of the ribosome to read the reassigned codon as a ncAA is comparison with misreading — was appraised using mass spectrometry. pUltra was able to incorporate one or two para-Azido-L-phenylalanine (pAzf) into sfGFP mutants with 95% and 93% fidelity for the single and double mutants, respectively. In addition, as expected, ncAA incorporation efficiency decreased with the number of incorporated pAzf from 50% to 10% relative to wild-type sfGFP for the single and double mutants, respectively. Conversely, pEvol-pAzFRS.2.t1 was not capable of introducing any pAzf into sfGFP mutants and produced around three times less sfGFP for the wild-type.



Ophélie BOSCH

La transplantation d'organe est un problème majeur de santé publique : chaque jour, 16 citoyens européens meurent en raison d'un manque de donneurs d'organes. Un moyen de résoudre ce problème est la médecine régénérative. Le principe de la médecine régénérative est l'établissement ou la restauration de la fonction d'un organe ou d'un tissu à partir de cellules saines. Un domaine de la médecine régénérative est le génie tissulaire. L'idée principale du génie tissulaire est de prendre des cellules d'un patient et de les faire proliférer in vitro. Ces cellules peuvent être cultivées sur des matrices en 3D, appelées scaffolds, afin d'imiter leur environnement naturel de croissance en 3D. Suite à une phase de maturation, les substituts de tissus peuvent être utilisés comme implants pour le patient. Le génie tissulaire permet de créer spécifiquement pour le patient des organes à partir de ces cellules, en évitant les problèmes d'immunogénicité. Il existe différentes manières de produire de tels tissus, dont l'une est l'impression 3D. Actuellement, seulement de petits tissus peuvent être imprimés, tels que de la peau ou des vaisseaux. L'un des projets de l'ITA est de créer un modèle de tubulointerstitium imprimable en trois dimensions. Le premier centre d'intérêt est porté sur les tubules et leur elongation radiale. Le but de ce projet de recherche est de déterminer l'influence de l'elongation des cellules épithéliales de l'intérieur de ces tubules tels qu'ils apparaissent dans des pathologies, comme par exemple une importante pression sanguine. Un bioréacteur capable d'étirer radialement les cellules cultivées sur des matrices textiles a été développé à l'ITA. Le but de ce stage était de trouver une membrane étirable adaptée pour la croissance des cellules. Trois membranes ont été testées : le polyuréthane thermoplastique, les copolymères styréniques et le polyuréthane. Les copolymères styréniques semblent être la membrane la plus adaptée pour la croissance des cellules dans le bioréacteur d'elongation. Ce textile est recouvert d'une protéine (par exemple la gélatine ou la fibrine), ce qui permet l'adhérence des cellules à la membrane. Aussi, un hydrogel de fibrine est nécessaire pour permettre aux cellules de croître en trois dimensions. La caractérisation rhéologique de cet hydrogel est la prochaine étape de ce projet. Une fois que le textile, la protéine utilisée pour recouvrir la membrane et le gel seront déterminés, les effets de l'elongation sur le comportement des cellules seront évalués.



Organ transplantation is a major issue of public health: everyday, 16 European citizens die due to a lack of organ donors. One approach to counter this issue is regenerative medicine. The basic principle of regenerative medicine is the establishment or restoration of the function of an organ or a tissue from healthy cells. One field of regenerative medicine is tissue engineering. The basic idea of tissue engineering is to take cells from a patient and proliferate them in vitro. These cells can then be seeded on 3D matrices, so called scaffolds, to mimic their natural 3D growth environment. After a maturation phase, the produced tissue substitutes can be used as an implant for the patient. Tissue engineering allows therefore to design organs specifically for the patient with his cells, avoiding immunogenicity issues. There are different ways to produce such constructs, one is 3D bioprinting. Currently, only small constructs can be bioprinted, such as skin or vessels. One project of ITA is to create a model of tubulointerstitium printable in three dimensions. The first focus is about tubules and their radial elongation. The aim of this research project is to determine the influence of the elongation of the epithelial cells on the inside of these tubules as they occur in pathologies such as high blood pressure. A bioreactor able to radially stretch cells seeded on textiles was developed at the ITA, and the aim of this internship was to find a stretchable membrane suitable for cell growth. Three membranes were tested: thermoplastic polyurethane, styrenic copolymers and polyurethane. Styrenic copolymers seems to be more suitable for cell growth in the stretching bioreactor. This textile needs to be coated with a protein (e.g. gelatin or fibrinogen) to properly adhere cells to the membrane. A hydrogel of fibrin is needed to allow cell growth in three dimensions. Rheological characterization of the hydrogel is a next step of that study. Once textile, coating protein and gel are determined, effects of stretching on cells behavior will be evaluated.



Lisa BRUNO

During my internship, I have been able to take part in a research team, belonging to the Department of Biological and Environmental Sciences of the University of Hertfordshire, focusing on mycoviruses. These viruses specifically infect and replicate in fungi. It is accepted that most mycovirus infections are cryptic. However, under certain environmental conditions, symptoms can be induced and small but significant effects can be observed. In nature, mycoviruses are usually associated with hypovirulence (reduced virulence) or more unusually hypervirulence. One of the main purposes of studying mycoviruses is to use them as biocontrol agents. They could ultimately be used to manipulate the virulence of entomopathogenic fungi (fungi capable of causing disease in insects) and thus become an environmentally friendly alternative to chemical pesticides. In the case of plant pathogenic fungi, on which I focused, hypovirulence-associated mycoviruses could be used to control fungal diseases instead of aerial application of fungicide sprays.

The studies I carried specifically focused on two double-stranded (ds) RNA mycoviruses. *Dothistroma septosporum* chrysovirus 1 (DsCV-1) is a mycovirus isolated from the pine pathogenic fungus *Dothistroma septosporum*. This fungus is a foliar pathogen of pine trees responsible for a disease known as *Dothistroma Needle Blight* (DNB), which is an economically important disease of conifers. It causes an early needle defoliation and, in the most severe cases, tree death and affects more than 70 species of pine. It has resulted in significant damage to pine forests worldwide. I also worked on another plant pathogenic fungi named *Leptosphaeria biglobosa*, that is responsible for phoma stem canker on oilseed rape, and especially on the mycovirus *Leptosphaeria biglobosa* Quadrivirus 1 (LbQV-1).

During my immersion in the laboratory, I have in particular been able to acquire many molecular biology techniques (dsRNA extraction, RT-PCR, cloning, qPCR...) as well as microbiological ones (fungal cultures). I also had the opportunity to perform some computer analyses concerning a viral genome.



Lors de mon stage, j'ai intégré une équipe de recherche au sein du département des Sciences Biologiques et Environnementales de l'Université du Hertfordshire. Cette équipe se focalise principalement sur l'étude des mycovirus. Ces derniers infectent spécifiquement les champignons. La plupart des infections par les mycovirus sont asymptomatiques. Cependant, dans certaines conditions environnementales, des effets faibles mais significatifs peuvent être observés. Dans la nature, les mycovirus sont généralement associés à une hypovirulence (virulence réduite) ou, moins habituellement, à une hypervirulence. L'un des principaux objectifs de l'étude des mycovirus est de, à terme, les utiliser comme agents de biocontrôle. Ils pourraient en effet servir à manipuler la virulence de champignons entomopathogènes (capables de provoquer des maladies chez les insectes) et ainsi devenir une alternative écologique aux pesticides chimiques. Dans le cas des champignons phytopathogènes, sur lesquels je me suis concentrée, l'hypovirulence provoquée par certains mycovirus pourraient être utilisés pour lutter contre les maladies fongiques. Ils permettraient ainsi de remplacer l'application aérienne de fongicides.

Les études que j'ai effectuées ont spécifiquement porté sur deux mycovirus, dont le génome est constitué d'ARN double brin. *Dothistroma septosporum* chrysovirus 1 (DsCV-1) est un mycovirus isolé à partir d'un champignon pathogène du pin, *Dothistroma septosporum*. Ce champignon est responsable d'une maladie appelée la maladie des bandes rouges, ayant de graves conséquences économiques. Elle provoque une défoliation précoce des conifères et, dans les cas les plus graves, la mort des arbres et touche plus de 70 espèces de pins. J'ai également travaillé sur un autre champignon phytopathogène appelé *Leptosphaeria biglobosa*, responsable du phoma du colza, et en particulier sur le mycovirus *Leptosphaeria biglobosa* Quadrivirus 1 (LbQV-1).

Au cours de mon immersion en laboratoire, j'ai notamment eu l'opportunité d'acquérir de nombreuses techniques de biologie moléculaire (extraction d'ARN double brin, RT-PCR, clonage, qPCR...) ainsi que des techniques microbiologiques (cultures de champignons). Certaines études informatiques concernant l'analyse d'un génome viral m'ont également été confiées.



Julie CALAME

Développement d'outils génétiques destinés à la production de composés durables chez *Rhodopseudomonas palustris*.

Les recherches menées dans le laboratoire de M. Buck portent principalement sur l'étude de systèmes bactériens présentant de grands intérêts dans les secteurs de l'agronomie, de la médecine et de l'industrie. Robert Bradley est particulièrement impliqué dans le domaine de la biologie de synthèse, avec pour objectif la construction de systèmes génétiques permettant d'introduire de nouvelles fonctions biologiques chez certains micro-organismes. Il étudie principalement la communication électrique pouvant s'établir entre une bactérie et un système électronique physique, et travaille actuellement sur le développement d'outils génétiques visant à modifier *Rhodopseudomonas palustris*. Cette bactérie pourpre présente en effet des capacités intéressantes puisqu'elle est entre autres capable d'électrosynthèse. In fine, ce micro-organisme pourrait donc être utilisé pour des applications biotechnologiques et notamment servir à la production de composés chimiques d'intérêt après stimulation par courant électrique.

Durant ce stage, mon projet a été divisé en deux parties. Lors de la première, j'ai travaillé sur le PHB qui est un précurseur de bioplastique. Il s'agit d'un composé chimique de grand intérêt puisqu'il peut être produit et dégradé par des micro-organismes. Mon projet impliquait la production de PHB grâce à l'insertion d'une nouvelle voie métabolique chez *R.palustris*, mais aussi le développement d'un test permettant d'en détecter la production. La seconde partie de mon projet avait pour but le développement d'outils génétiques destinés à l'expression ou à l'inactivation génique chez *R.palustris*. Pour cela, de nouvelles origines de répliations (ORIs) et de nouveaux gènes de sélection (positive et négative) ont été testés. Dans le futur, la combinaison de ces gènes de sélection pourrait aboutir à la création d'un système d'inactivation génique dédié à *R.palustris*.

L'entièreté de mon projet a reposé sur l'utilisation d'une nouvelle méthode de clonage moléculaire appelée Start-Stop Assembly. C'est une technique basée sur les principes du Golden Gate et donc sur l'utilisation d'enzymes de type IIS qui coupent l'ADN en dehors de leur site de reconnaissance. Ces sites sont alors designés de façon à obtenir des fragments d'ADN orientés, ce qui permet au final la création d'unités d'expression fonctionnelles complètement dénuées de cicatrices.



Engineering *Rhodopseudomonas palustris* for sustainable bioproduction.

The Buck lab research group studies bacterial systems of agronomic, medical, and industrial relevance. Robert Bradley's research is in the field of synthetic biology and involves the design and construction of genetic systems that introduce new capabilities to microorganisms. One of the main themes of his work is electrical communication between bacteria and physical electronic circuitry. As the purple bacterium *Rhodopseudomonas palustris* possesses many interesting and industrially relevant capabilities, he tries to develop genetic tools in order to engineer it for biotechnological applications, including enhancing its capacity for electrosynthesis (using supplied electrical current to produce useful chemicals).

During this internship, my project was divided into two different parts. First, I worked on PHB production and detection. PHB is a chemical of great interest as it is a bio-derived and biodegradable precursor for bioplastic production. I had to design genetic constructs in order to express a pathway for PHB production into *R.palustris* and then to develop assays for PHB detection. The second part of my project was to make genetic tools for expression and genetic inactivation into *R.palustris*. I tested genetic constructs containing new origins of replication, but also genetic constructs containing new genes for positive and negative selections that could be used in the future to build a knock-out system.

Both parts of my project used the Start-Stop Assembly technique. Start-stop Assembly is a cloning method built on the principles of the Golden Gate Assembly. It uses Type IIS restriction endonucleases that are enzymes that cut DNA offset from their recognition site. Restriction sites are designed to confer directionality and to allow the creation of functionally-scarless expression units.



Germain CASSOU

INVETECH

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Jon ELLIS**

Automatisation d'un procede CART.

Les procédés CART sont développés et mis sur le marché sur la base d'un processus de production essentiellement manuel. Bien qu'ils soient suffisants pour l'approbation réglementaire et les premières productions commerciales, les taux élevés de défaillance, les coûts de fabrication, la complexité et la variabilité sont trop importants à ce jour pour soutenir la fabrication à l'échelle commerciale et ne sont pas viables pour la rentabilité future des entreprises commercialisant de tels produits. Le rêve lointain d'un processus entièrement automatisé et pratiquement clos pourrait bientôt devenir réalité. Invetech, ayant une de ses activités en thérapie cellulaire, est un acteur majeur dans ce domaine.

La première étape de l'étude de cas réalisée par l'entreprise consiste à identifier les étapes clés du processus qui contribuent à une perte importante des cellules, puis à scanner les différents équipements actuellement disponibles sur le marché qui pourraient remédier à ce problème, mais aussi visant à améliorer l'efficacité de fabrication et réduire les coûts globaux de production. L'étape suivante, qui a été la majeure partie de mon travail pendant ce stage, est donc de tester chaque équipement séparément sur les étapes clés identifiées, principalement le lavage des aphereses et des cellules T, mais aussi l'expansion des cellules T. Lorsque vous travaillez sur un processus CART, l'analytique représente une part prépondérante de vos expérimentations pour plusieurs raisons : le nombre et la viabilité de vos cellules sont bien sûr des données importantes, mais le profil de votre population cellulaire est également fondamental. L'un des principaux défis de l'automatisation de la production de ces procédés est d'obtenir des résultats répétables même si vous partez d'un matériel de départ qui va s'avérer différent d'un patient à l'autre.

Par la suite, l'enchaînement, tout au long du processus, des différents équipements sélectionnés devra être testé et s'avérer dans l'idéal aussi efficace et agréable pour l'opérateur, tout en maintenant la fiabilité du processus.

L'amélioration des processus CART actuels, mais aussi l'imagination de nouvelles générations, est aujourd'hui plus d'actualité que jamais. Les défis techniques sont aussi importants que les promesses faites par ces thérapies.

SAN DIEGO • Etats-Unis

10/06/2019 → 27/09/2019



CAR-T manufacturing automation.

CAR-T therapies, whilst highly clinically efficacious, have been developed and commercialized based on largely manual, operator dependent manufacturing process. While sufficient for regulatory approval and early commercial production, the high failure rates, manufacturing costs, complexity and variability are inadequate to support commercial-scale manufacturing, scale-out across and unsustainable for future profitability. Fully automated, commercial scale, functionally closed manufacturing processes are urgently needed to ensure availability of consistent, clinical products. Invetech's Cell Therapy division has been focused on such an approach for over 15 years and is major player in the field.

The first step in such an approach is identifying the key steps or unit operations of the process that contribute to significant cell loss and reviewing commercially available platform technologies that may offer performance improvements, reduce operator dependency and minimize overall manufacturing costs. The next step, which was most of my work during this internship, is so to test each equipment separately on each identified key step: apheresis wash, T cell selection and T cell washes and T-cell expansion. When working on a CAR-T process, analytics represents a preponderant part for several reasons: the number and viability of your cells are of course important data, but the profile of your cell population is also fundamental. One of the main challenges in the manufacturing automation of these processes is to obtain manufacturing consistency, starting from highly variable raw material due to patient disease and prior therapies.

Thereafter, the proposed platform technologies should be tested in sequence in complete manufacturing processes to demonstrate at least performance equivalence while increasing automation, operator independence, a functionally closed environment.

The improvement of current CAR-T processes, but also the evaluation of new generations of them, is now more relevant than ever. The challenges are as important as the promises made by these therapies.



Myra CASTEL

ARBOR VITA Corporation

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

Développement et production du test de diagnostic OncoE6™ Cervical Test.

Le cancer du col de l'utérus est le quatrième cancer le plus fréquent chez les femmes et le huitième à travers le monde. Plus de 99% des cas de cancer sont dus à une infection par le papillomavirus humain (HPV), qui est le virus sexuellement transmissible le plus commun. Même si dans la majorité des cas le système immunitaire élimine spontanément le virus après quelques mois, il arrive que le virus résiste. Il existe de nombreux types de HPV, dont certains sont classés en tant que virus "à haut risque". Si une infection par un virus à haut risque persiste, elle peut mener à des lésions précancéreuses voire cancéreuses. Plusieurs méthodes de dépistage existent, comme le frottis, mais elles ne sont pas assez spécifiques ou sensibles ou sont trop coûteuses.

C'est pourquoi Arbor Vita a développé un test de diagnostic, OncoE6™ Cervical Test, qui est hautement spécifique et précis pour diagnostiquer les maladies utérines. Ce test est basé sur la reconnaissance de la protéine oncogène E6 des HPV 16 et 18 (responsables de 70% ou plus des cancers du col de l'utérus) connue pour être nécessaire et suffisante au développement du cancer du col de l'utérus. L'objectif principal du stage était de participer à diverses étapes de la production du test dans un environnement GMP, comme la culture des hybridomes produisant les anticorps permettant de capturer et de détecter l'oncoprotéine E6, la purification des anticorps par chromatographie ou encore l'assemblage des tests. Des activités concernant le développement du produit ont également été réalisées.

FREMONT • Etats-Unis

05/06/2019 → 27/09/2019



Product development and manufacturing of the diagnostic test OncoE6™ Cervical.

Cervical cancer is the fourth most frequent cancer in women and the eighth most common cancer worldwide. More than 99% of cervical cancer cases are due to an HPV infection (Human PapillomaVirus), which is the most common sexually transmitted virus. In most cases, the immune system spontaneously eliminates the virus after a few months, but sometimes the virus persists. There are numerous types of HPV, among which "high-risk HPV" (hr-HPV) are found. If an infection with high risk HPV persists, it might lead to precancerous and cancerous lesions. Several cervical screening methods exist, such as the Pap smear test, but they are either not specific or sensitive enough or are too expensive.

This is why Arbor Vita has developed a diagnostic test called OncoE6™ Cervical Test, which is highly specific and accurate for cervical disease. The test is based on the recognition of the E6 oncoprotein from the HPV-16 and HPV-18 (responsible for 70% or more of cancer cases), known to be necessary and sufficient for carcinogenic initiation and progression. The main objective of the internship was to participate in various steps of the manufacturing of the test in a Good Manufacturing Practices environment (GMP), such as the culture of the hybridomas producing the antibodies which capture and detect the E6 oncoprotein, the chromatographic purification of the antibodies or the assembly of the test units. Product development activities were also performed.



Carlotta CATTOLICO

INSERM DR Paca et Corse

Tuteur(s) / Supervisor(s): Gilles PAGES

Le cabozantinib : une nouvelle cible thérapeutique dans les cancers de la tête et du cou.

Le cabozantinib est un puissant inhibiteur des récepteurs c-MET (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes), AXL (récepteur à activité tyrosine kinase) et VEGFR-2 (récepteur du facteur de croissance VEGF) actuellement utilisé dans le traitement du carcinome rénal. La surexpression de ces cibles est associée à l'agressivité des cellules tumorales et à la résistance aux traitements standards dans les cancers de la tête et du cou. Cibler ces récepteurs représente une piste pour le traitement de ces cancers dont le taux de mortalité notamment lors de la rechute reste élevé. Cette nouvelle stratégie thérapeutique est particulièrement intéressante pour le traitement des patients résistants aux thérapies usuelles (30 à 50% des patients). L'efficacité du cabozantinib sur les phénomènes de migration, d'invasion et de prolifération a été évaluée et démontrée sur des lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes de la langue (CAL 27 et CAL 33) sensibles et rendues résistantes à la radiothérapie et/ou chimiothérapie (cisplatine). Ces résultats confirment donc la position du cabozantinib comme nouvelle stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers de la tête et du cou, y compris pour les patients radio- et chimio-résistants.

MARSEILLE • France

12/08/2019 → 27/08/2019



Cabozantinib : a new therapeutic target in head and neck cancer.

Cabozantinib is a potent inhibitor of c-Met (hepatocyte growth factor receptor), AXL (tyrosine kinase receptor) and VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor) that is currently in use for renal cell carcinoma treatment. Yet, overexpression of these targets is linked to tumor cells aggressiveness and resistance of standard treatments in head and neck cancer. Thus, targeting these receptors is a potent lead for head and neck cancer treatment and is particularly interesting for patients resistant to usual therapies (30 to 50% of patients). Cabozantinib's effectiveness on migration, invasion and proliferation phenomena is assessed and demonstrated on cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue (CAL27 and CAL33) both sensitive and resistant to radio and/or chemotherapy (cisplatin). Therefore, these results confirm cabozantinib's position as a new potential therapeutic strategy for the treatment of head and neck cancer, including radio- and chemo-resistant tumors.



Isabelle CHANEMOUGA

LONGBOAT EXPLORERS

Tuteur(s) / Supervisor(s): Jan TALTS

Détermination de caractéristiques de croissance de Cellules Souches Mésoenchymateuses provenant de liquide amniotique.

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes possédant de nombreuses qualités. C'est pourquoi leur utilisation est aujourd'hui étudiée dans de nombreux essais cliniques, à la fois pour la réparation osseuse ou cartilagineuse, et pour le traitement de maladies dégénératives et inflammatoires. Les CSM peuvent provenir de différentes sources, adultes ou néonatales. Les CSM d'origine néonatale, étant « plus jeunes » donc ayant subi moins de dommages cellulaires, se révèlent être de meilleure qualité. Le but de Longboat Amniotics est d'entrer sur le marché de la vente de CSM néonatales. En effet, ils collectent des dons de liquide amniotique à l'hôpital lors d'accouchements par césarienne, à partir duquel ils extraient des CSM. Ces cellules auront ensuite pour but d'être utilisées et vendues pour des essais cliniques. Actuellement, l'entreprise est en phase de recherche et développement afin de déterminer le meilleur processus de culture, permettant d'obtenir un grand nombre de cellules tout en respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication. Durant ce stage, j'ai cultivé ces CSM pour tracer des courbes de croissance et déterminer des caractéristiques de croissance cruciales, tels que la durée des phases de latence et de croissance exponentielle, ainsi que le temps de génération. J'ai répété cette étude avec des milieux et des cellules de donneurs différents, pour étudier l'impact de ces paramètres. Les résultats obtenus seront utilisés comme point de départ de futures expériences, notamment pour transposer le procédé à une plus grande échelle.

LUND • Suède

03/06/2019 → 30/08/2019



Determination of growth characteristics of amniotic fluid derived Mesenchymal Stem Cells.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent cells with numerous abilities which make them involved in lots of clinical studies for bone and cartilage repair, as well as for the treatment of inflammatory and degenerative diseases. MSCs can originate from various sources, either adult or neonatal tissues. MSCs from neonatal sources appear to be of higher quality, as they had less time to undergo cellular damages. Longboat Amniotics aims at entering the neonatal MSCs market. Indeed, they extract MSCs from amniotic fluid collected at the hospital during caesarean sections. Those cells are then intended to be used and sold for clinical trials. Research is currently carried out to set up the best culturing procedure to obtain high cell density with Good Manufacturing Processes. In this consideration, a good knowledge of the cell growth is required. During my internship, I cultured these amniotic fluid derived MSCs to create growth curves and determined some crucial growth characteristics, such as the length of the lag and log phase, and the population doubling time. I repeated this work using different media and samples originating from different donors, to show if the growth was dependent on these parameters. The results obtained will be used as a basis for further experiments, and will help to make estimation when scaling up the culturing process.



**Mathilde
CHARPENTIER**

COVALX ANALYTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): Marion SOLE

Epitope Mapping par échange isotopique hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse.

Le développement d'un médicament, de la molécule à sa commercialisation, est souvent très long (plusieurs dizaines d'années). En effet, avant d'être commercialisée, la molécule thérapeutique doit subir de nombreuses analyses et tests cliniques, indispensables afin d'assurer la sécurité du patient. Parmi les médicaments développés chaque année, on retrouve les anticorps monoclonaux thérapeutiques dont le marché s'élève aujourd'hui à 100 milliards de dollars. Face à de tels enjeux, il est devenu extrêmement important pour les entreprises pharmaceutiques d'obtenir des brevets protecteurs pour leurs anticorps, mais cela peut parfois s'avérer difficile. Obtenir des informations sur la cartographie de l'épitope permet de considérablement renforcer les brevets. Ainsi, entre 2010 et 2016, la proportion de demandes de brevet d'anticorps utilisant de manière stratégique des informations sur les sites de liaison a presque doublé, passant de 13% à 24%.

La société CovalX au sein de laquelle j'ai réalisé ce stage propose des services d'analyse permettant de cartographier des épitopes linéaires ou conformationnels, étudier des interactions protéine-protéine ou protéine-petite molécule, réaliser des études conformationnelles... Cela est effectué en utilisant la spectrométrie de masse ; qui s'avère être un outil puissant et rapide ; couplée soit à des digestions enzymatiques, soit à un échange isotopique. Les analyses que j'ai effectuées se sont appuyées sur l'échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX MS). Le but était de déterminer la zone d'interaction entre un antigène et un anticorps. Placé dans un solvant deutéré, les atomes d'hydrogène de l'antigène s'échangent contre du deutérium. La présence ou l'absence d'un anticorps entraîne une différence dans le taux d'échange hydrogène-deutérium, permettant d'accéder à des informations relatives à l'endroit où se fixe l'anticorps sur l'antigène.

BORDEAUX • France

03/06/2019 → 30/09/2019



Epitope mapping using hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry.

Drug development, from a molecule to its commercialization, can take quite some time (several dozens of years). Indeed, before being placed on the market, the therapeutic molecule has to undergo several analyses and clinical tests, which are essential to ensure the patient's safety. Among the drugs developed each year, monoclonal antibodies represent a significant part since their sales stand at 100 billions of dollars. Given the stakes involved, it has become exceedingly important for pharmaceutical companies to obtain broad patents covering their antibodies, but getting them may sometimes be difficult. Epitope mapping allows to significantly strengthen patents. Thus, from 2010 to 2016, the proportion of antibody patent applications having epitopes in their claims has nearly doubled from 13% to 24%.

The CovalX Company in which I completed this internship offers analysis services to map conformational or linear epitopes, study protein-protein or protein-small molecule interactions, provide information about conformational states... all of this using mass spectrometry, which turns out to be a fast and powerful tool, coupled with either enzymatic digestions or isotopic exchange. I realized these analyses based on hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX MS). The goal was to identify the area of interaction between an antigen and an antibody. When diluted in heavy water (D2O), backbone hydrogens of amino acids of the antigen exchange with deuterium. The presence or absence of an antibody results in a difference of the rate exchange, and allows to access information such as where the antibody binds on the antigen.



Guirec CLOAREC

COVALX ANALYTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): Mamadou SY

Analyse de protéines thérapeutiques par spectrométrie de masse : application de la XL-MS et des mesures MALDI-ToF Haute Masse pour l'étude de complexes anticorps-antigène.

Depuis la mise en évidence de l'intérêt thérapeutique des anticorps par Von Behring en 1890 (récompensé par le prix Nobel en 1901), ces biomolécules sont devenues le fer de lance de l'industrie biopharmaceutique, représentant un marché de plus de 100 milliards d'euros en 2017 uniquement pour les anticorps monoclonaux thérapeutiques. La caractérisation de ces molécules ainsi que de leurs interactions dans un complexe est indispensable pour la compréhension des mécanismes impliqués et le développement de nouvelles thérapies, mais aussi pour le dépôt de brevets.

CovalX Analytics propose des services d'étude basés sur les différentes techniques de spectrométrie de masse. Au cours de mon stage, j'ai étudié et utilisé la technologie de XL-MS (Spectrométrie de masse couplée aux cross-links) afin de réaliser des epitopes mappings, ainsi que la technique HDX (technique basée sur l'échange isotopique Hydrogène Deutérium). J'ai également travaillé sur des spectromètres de masse MALDI-ToF équipés d'un détecteur Haute masse CovalX pour déterminer la masse et le niveau d'agrégation de protéines et notamment d'anticorps en développement pour le compte de grands laboratoires pharmaceutiques.

L'épitope mapping est le processus qui consiste à déterminer les acides aminés impliqués dans la liaison de l'épitope antigénique au paratope de l'anticorps, ainsi que leurs localisations sur l'antigène. La nature faible de ces interactions a nécessité l'utilisation de cross-linkers afin de stabiliser les complexes.

BORDEAUX • France

03/06/2019 → 30/08/2019



Therapeutic proteins analysis by mass spectrometry: application of XL-MS and MALDI-ToF High Mass measurements for the study of antibody-antigen complexes.

Since Von Behring's discovery of the therapeutic value of antibodies in 1890 (Nobel Prize in 1901), these biomolecules have become the spearhead of the biopharmaceutical industry, representing a growing market of more than €100 billion in 2017 for therapeutic monoclonal antibodies alone. The characterization of these molecules as well as their interactions in a complex is essential to understand the mechanisms involved (/the development of new therapies) but also for patents filing.

CovalX Analytics offers characterization services based on different mass spectrometry techniques. During my internship, I studied and used the XL-MS (Cross-link Mass Spectrometry) technology to perform epitopes mapping, as well as the HDX technique (technique based on the Hydrogen Deuterium isotope exchange). I also worked on a MALDI-ToF equipped with a CovalX high-mass detector to determine the mass and the aggregation level of proteins, particularly for antibodies under development for famous pharmaceutical laboratories.

Epitope mapping is the process of determining the amino acids involved in the binding between the antigenic epitope to the paratope of the antibody as well as their locations. The low energy bonds involved required the use of cross-linker reagent to stabilize complexes as they do not withstand the mass spectrometry ionisation.



Chrislain COUBARD

AALBORG University

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Jeppe LUND NIELSEN**

Biodégradation microbienne de plastique biodégradable dans un digesteur anaérobie

Le groupe de biotechnologie environnementale de l'Université d'Aalborg est spécialisée dans l'étude de communautés microbiennes et de leur impact sur l'environnement et sur certaines activités humaines telles que les stations d'épurations. J'ai effectué mon stage avec l'objectif global d'étudier les interactions entre certains types de plastiques et des boues actives provenant de la station d'épuration de Aalborg Ouest. L'étude a été faite sur deux types de plastiques biodégradable : l'acide poly lactique et les polyhydroxyalcanoates. Les deux types de plastique ont été étudiés séparément mais selon le même procédé. Tout d'abord une incubation de 12 jours de morceaux de plastique dans un système équivalent au digesteur anaérobie de la station d'épuration avec de la boue active provenant directement de cette dernière. Tous les 4 jours, une partie du plastique et de la boue était retirée de l'expérience, afin de pouvoir étudier le système dans le temps. A l'issue de cette phase d'incubation les morceaux de plastique a d'un côté été analysé avec des techniques de spectroscopie de surface (spectroscopie Raman, FTIR) afin d'observer une modification de la composition de cette surface, l'identification de possibles sous-produits de cette dégradation afin de déterminer les mécanismes provoquant cette dégradation. D'un autre côté l'ADN présent à la surface du plastique a été isolé, puis amplifié grâce à la technique de séquençage d'amplicon. Le but étant d'amplifier une région spécifique d'un gène (ici le domaine V4 du gène 16S) afin d'identifier le genre des bactéries de surface. L'identification est possible grâce au fait que le domaine V4 soit un des 9 domaines hypervariable du gène 16S rRNA, alors que le reste de ce gène est très conservé dans le monde bactérien. Le but de cette étude était de voir si des dégradations pouvaient être observée sur les morceaux de plastiques, ainsi que les types de bactéries qui se développaient au cours du temps sur ces morceaux.

AALBORG EAST • Danemark

03/06/2019→03/10/2019



Microbial biodegradation of biodegradable plastics in anaerobic digester.

The environmental biotechnology group from Aalborg University is specialised in the study of microbial community and their impact on environment et some human activities such as wastewater treatment plants. I performed my internship with the global goal to study the interactions between a couple types of plastics and activated sludge from the Aalborg West wastewater treatment plant. The study was performed on 2 types of biodegradable plastics: Polyhydroxyalkanoates and polylactic acid. The two types of plastic were studied separately but with the same process. First, a 12 days incubation of plastic pieces was done in an equivalent system to the anaerobic digester from the wastewater treatment plant with activated sludge coming directly from it. Every 4 days, part of the plastic and sludge were removed from the experiment, allowing the study of the system over time. After the incubation, plastic pieces were, on one hand, analysed using surface spectroscopic method (Raman spectroscopy, FTIR) to observe the modification of surface composition, identification of possible degradation by-products and the possible understanding of such degradation. On the other hand, the surface DNA from the plastic pieces was isolated then amplified thanks to the amplicon sequencing method. The goal of this method is to amplify a specific part of a gene (here the V4 domain of the 16S rRNA gene) to identify the genre of surface bacteria. This identification is possible thanks to the fact that the V4 domain is one of the 9 hypervariable domains of the 16S rRNA gene whereas the rest of the 16S rRNA gene is very similar through the bacterial world. The goal of this study was to see if degradation could be observed on the plastic pieces, and the kind of bacteria that would develop overtime on those pieces.



Maelle DE MARCO

Laboratoire URBE Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Catherine MICHAUX**

Optimisation d'une méthode de renaturation de la protéine membranaire PagP

La production de protéines membranaires pose aujourd'hui un problème majeur : leur dénaturation. Il n'existe pas de méthode universelle qui permet d'obtenir systématiquement une renaturation rapide et efficace. C'est dans ce contexte que le laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules de l'Université de Namur a découvert la méthode de renaturation SDS (sodium dodécylsulfate)-cosolvant. Elle associe le SDS, qui permet la formation de micelles autour des protéines membranaires, et un cosolvant amphiphile.

L'objectif de ce projet a donc été de caractériser la renaturation de la protéine membranaire PagP, une palmitoyltransférase des bactéries à Gram négatif, afin d'optimiser la méthode SDS-cosolvant. La production de PagP chez une souche de E.coli puis sa purification ont été réalisées. Ensuite, différentes conditions de renaturation ont été testées : concentrations en SDS, différents cosolvants, présence de sels, différents pH ou temps d'incubation. L'analyse de la renaturation par gel d'électrophorèse SDS-Page (où la renaturation est visualisée par un shift conformationnel de PagP), fluorescence intrinsèque du tryptophane, dichroïsme circulaire et tests d'activité enzymatique ont permis de montrer plusieurs optimisations. En effet, la concentration en SDS a pu être diminuée ; la présence de NaCl a permis de diminuer la concentration en cosolvant nécessaire à la renaturation ; certains cosolvants ont mis en avant une efficacité de renaturation plus importante ou encore certaines conditions ont considérablement amplifié l'activité enzymatique.

Cette nouvelle méthode SDS-cosolvant semble donc prometteuse et en bonne voie pour devenir une méthode universelle de renaturation.

NAMUR • Belgique

03/06/2019→20/09/2019

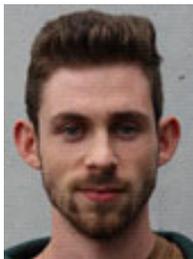


Optimization of a refolding method of the membrane protein pagP.

Nowadays, proteins production can be a significant issue due to the proteins unfolding. There is no one-size-fits-all approach which allows to systematically obtain a fast and effective refolding. In this context, the Chimie Physique des Biomolécules laboratory of the University of Namur has discovered the refolding method named SDS (sodium dodecylsulfate) - co-solvent. This process joins the SDS, which allows micelles formation around membrane proteins, and an amphiphilic co-solvent.

The goal of this internship was to characterize the refolding of the membrane protein PagP, a palmitoyltransferase of Gram-negative bacteria, in order to optimize the SDS - co-solvent method. The PagP production in a E. coli strain and its purification have been carried out. Many conditions have been then tested: SDS concentrations, different co-solvents, salts presence, different pH or incubation times. The refolding analysis by SDS-Page gel electrophoresis (where refolding is visualized by conformational shift of PagP), intrinsic tryptophan fluorescence, circular dichroism and enzymatic assays led to several optimizations. Indeed, the SDS concentration has been decreased, NaCl has allowed a decrease of co-solvent concentration, some co-solvents have highlighted a more effective refolding and some conditions have drastically amplified enzymatic activity.

In conclusion, this new method appears promising and well advanced to become an one-size-fits-all approach of the refolding analysis.



Lucas DELAYE

LAFFORT

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Julia CAPITANIO**

Evaluation de l'effet de substances naturelles sur la fermentation malolactique dans le vin – Développement d'un protocole dénombrement de levures viables par cytométrie en flux.

Ce stage intervient dans le cadre d'un projet de réduction des sulfites dans les vins, lancé en 2017 par Laffort, en partenariat avec l'IFV de Nantes et l'ITEIPMAI. Ce projet vise à remplacer les sulfites par des substances naturelles. Un des objectifs de ce stage a été d'évaluer l'effet de substances naturelles sur le déclenchement de la fermentation malolactique (FML) dans les vins. La FML intervient après la fermentation alcoolique et consiste en la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique, qui entraîne entre autres une désacidification du vin. La FML peut se déclencher soit spontanément avec la flore indigène du vin, soit par l'ajout de ferments lactiques sélectionnés. Selon le type de vin recherché, la FML peut être désirée ou non. A l'heure actuelle, c'est l'ajout de sulfites au vin qui permet d'empêcher cette fermentation de se dérouler. Aussi, différentes substances naturelles ont été testées sur vin pour évaluer leur effet bloquant sur la FML dans le but ultime de proposer une alternative naturelle aux sulfites pour cette application. Dans la continuité de ce projet, une dégustation a été réalisée afin d'étudier statistiquement l'impact de l'ajout de ces substances naturelles sur les qualités organoleptiques des vins. Un programme a été créé sur le logiciel Rstudio pour automatiser le traitement du grand nombre de données recueillies. Enfin, en parallèle de ce projet, une dernière mission m'a été confiée : la mise en place d'un protocole de dénombrement de levures viables par cytométrie en flux. Celui-ci repose sur le marquage fluorescent des levures viables qui sont détectées et comptées à l'aide d'un cytomètre en flux. Le protocole mis en place a été comparé à un kit commercialisé pour le dénombrement des levures dans le vin reposant sur le même principe.

FLOIRAC • France

03/06/2019 → 19/09/2019



Study of natural extracts antiseptic activity – Development of a viable yeast counting protocol by flow cytometry.

This internship takes place in a project of reduction of sulphites in wines which has been launched by Laffort in 2017. This project is in partnership with the IFV of Nantes and the ITEIPMAI. It aims to replace the sulphites in wines by natural extracts. One of the tasks of this internship was to determine how far several extracts have the ability to stop the malolactic fermentation (MLF) in wines. This fermentation is usually made after the alcoholic fermentation and consists in a decarboxylation of malic acid to create lactic acid. It principally leads to a reduce acidity. The MLF can be spontaneously initiated by indigenous flora or by lactic ferments addition. Thanks to the wine type, the FML can be desired or not. Today, sulphites addition is used to avoid this fermentation. In this context, several natural extracts have been tested on different wines to assess their anti-malolactic fermentation activity. In the continuity of this project, a wine tasting has been organized in order to statistically assess the impact of the natural extracts on the wines organoleptic qualities. A computer program has been coded on Rstudio to automate the statistic exploitation of the large amount of data collected. In parallel of these two projects, the third mission of this training was to develop a protocol of viable yeast counting with flow cytometry. The protocol developed is based on the staining of viable cells by cDAF (carboxy-di-acetate-fluorescein). These cells are detected and counted with the flow cytometer. The approach was to compare the results of a commercial kit with the ones of the developed protocol.



Claire DESCLOUX

IPRATECH S.A.

Tuteur(s) / Supervisor(s): **David SERGEANT**

Culture de cellules mammifères en bioréacteur perfusé et production d'extraits cellulaires (cytoplasme, extraits nucléaires, S100, noyaux...). Mise au point et expérimentation d'un procédé de synchronisation cellulaire.

Ipratech est une société produisant des cellules et extraits cellulaires, mais qui développe et commercialise également des technologies visant à faciliter la mise en œuvre de la culture cellulaire (rétention cellulaire par filtration acoustique, régulation temps réel de la culture en batch, fedbatch et perfusion, comptage et monitoring temps réel via imagerie sans lentille).

En culture cellulaire, si une des activités principales de cette entreprise est la production de culots de cellules ainsi que d'extraits nucléaires et cytoplasmiques, le développement y a également une place cruciale. En effet, certains projets de recherche nécessitent que toutes les cellules se trouvent en un même point du cycle cellulaire afin de permettre l'isolation de molécules présentes en faible quantité uniquement durant certaines phases du cycle cellulaire.

Le projet a consisté en la définition et la mise en œuvre d'un procédé permettant la synchronisation cellulaire à l'aide d'un double ou d'un simple blocage à la thymidine suivi d'un blocage au nocodazole. En effet, la thymidine, en créant un excès de 2'-désoxythymidine dans la cellule, fait diminuer la disponibilité de 2'-désoxycytidine et inhibe ainsi la ribonucléotidase réductase, ce qui empêche la réplication de l'ADN et bloque les cellules à la frontière des phases G1/S. Le nocodazole, quant à lui, est un poison du fuseau mitotique qui polymérise les microtubules et bloque les cellules pendant la mitose. L'objectif final était ici l'optimisation de ce procédé afin de permettre une montée en échelle vers la production et la commercialisation de culots de cellules et d'extraits cellulaires synchronisés.

MONS • Belgique

03/06/2019 → 27/09/2019



Culture of mammalian cells in perfused bioreactor and production of cell extracts (cytoplasmic extracts, nuclear extracts, S100, nuclei). Development and experimentation of a cell synchronization process.

Ipratech is a company producing cells and cell extracts, but also developing and commercializing technologies to facilitate the implementation of cell culture (cell retention by acoustic filtration, real time control of batch, fed-batch and perfusion culture, counting and real-time monitoring via lensless imaging).

In cell culture, one of the main activities of this company is the production of cell pellets as well as nuclear and cytoplasmic extracts, but development is also crucial. Indeed, some research projects require all cells to be at the same point in the cell cycle to allow the isolation of molecules present in small amounts only during certain phases of the cell cycle.

The project consisted in the definition and the implementation of a process allowing the cell synchronization with a double or a simple blocking with thymidine followed by a blocking with nocodazole. Thymidine, by creating an excess of 2'-deoxythymidine in the cell, decreases the availability of 2'-deoxycytidine and thus inhibits ribonucleotide reductase, which prevents the replication of DNA and blocks cells at the G1/S phase boundary. Nocodazole is a mitotic spindle poison that polymerizes microtubules and blocks cells during mitosis. The ultimate objective here was the optimization of this process in order to scale up the production and commercialization of synchronized cell pellets and cell extracts.



Marine DUMONT

TALBOT LAB

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Sébastien TALBOT**

La douleur dans la maladie de Parkinson : mise en évidence du rôle des cellules immunitaires via l'utilisation d'un modèle animal.

La maladie de Parkinson, deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente en France derrière la maladie d'Alzheimer, est caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques dans la région du cerveau appelée substantia nigra pars compacta. Ceci conduit à un déficit en dopamine dans le striatum, une région du cerveau impliquée dans le contrôle des mouvements, ce qui cause les principaux symptômes moteurs de la maladie de Parkinson tels que la bradykinésie, la rigidité musculaire ou les tremblements. En plus de ces troubles moteurs, les personnes atteintes de cette maladie souffrent également de troubles non moteurs qui peuvent être une conséquence du déficit en dopamine dans d'autres régions du cerveau ou bien de dommages dans d'autres systèmes de neurotransmission (noradrénergiques, sérotoninergiques, etc). Bien que ces symptômes ne peuvent survenir que secondairement aux symptômes moteurs, environ 40% des patients souffrent de douleurs aux premiers stades de la maladie, mais les mécanismes impliqués demeurent peu connus. Dans le but d'améliorer le quotidien des patients et de trouver des traitements adaptés, il est important de comprendre l'origine de cette douleur ainsi que les mécanismes mis en jeu.

A l'heure où la neuro-immunologie est en plein essor, il a été démontré au sein du laboratoire du Dr Talbot que les systèmes immunitaires et sensoriels travaillent de concert dans l'organisme afin de promouvoir la défense de l'hôte et l'homéostasie. Cependant, dans certains cas, ces interactions peuvent être néfastes pour le patient. En effet, des études ont montré le rôle des altérations immunitaires notamment dans la douleur chronique mais on en sait cependant peu sur le rôle des altérations du système immunitaire sur la douleur dans la maladie de Parkinson. Par conséquent, mon rôle a été d'étudier le rôle des cellules immunitaires sur la douleur dans un modèle animal précoce de la maladie de Parkinson. Au travers de ces études, j'ai pu mettre en application de multiples techniques apprises durant ma formation telles que la PCR quantitative, l'immunohistochimie, la cytométrie en flux mais j'ai également pu étendre mes connaissances à travers l'utilisation de modèles animaux via notamment la réalisation d'études comportementales.

MONTREAL • Canada

03/06/2019 → 06/09/2019

Université  de Montréal



Pain in Parkinson's disease : demonstration of the role of immune cells through the use of an animal model.

Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disease in France behind Alzheimer's disease, is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the region of the brain called substantia nigra pars compacta. This leads to a dopamine deficiency in the striatum, a region of the brain involved in movement control, which causes the main motor symptoms of Parkinson's disease such as bradykinesia, muscle rigidity or tremors. In addition to these motor troubles, people with this disease also suffer from non-motor symptoms, which may be a consequence of dopamine deficiency in other brain regions or damage in other neurotransmission systems (noradrenergic, serotonergic, etc.). Although these symptoms can occur only secondarily to motor symptoms, about 40% of patients experience pain in the early stages of the disease but the mechanisms involved remain poorly understood. In order to improve the daily lives of patients and find appropriate treatments it is important to understand the origin of this pain and the mechanisms involved.

At a time when neuro-immunology is booming, it has been shown in Dr. Talbot's laboratory that the immune and sensory systems work together in the body to promote host defense and homeostasis. However, in some cases, these interactions can be harmful to the patient. Indeed, studies have shown the role of immune alterations especially in chronic pain, but little is known about the role of alterations of the immune system on pain in Parkinson's disease. Therefore, my role has been to study the role of immune cells on pain in an animal model of early Parkinson's disease. Through these studies I was able to apply multiple techniques learned during my schooling such as quantitative PCR, immunohistochemistry, flow cytometry but I was also able to extend my knowledge through the use of animal models and the conduct of behavioral studies.



Alexandra ESCOS

INSERM U 1053

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Violaine MOREAU**

Etude de l'interaction entre la protéine p190RhoGAP-A et la kinésine Kif2A.

Le cytosquelette joue un rôle indispensable dans de nombreux mécanismes physiologiques et notamment dans la division cellulaire. En effet, lors de la cytokinèse, le remodelage des filaments d'actine permet la séparation des deux cellules filles. Il est finement régulé par des RhoGTPases. L'une d'entre elles, la RhoGTPase RhoA est majoritairement contrôlée par la GAP (« GTPase Activating Proteins ») p190RhoGAP-A (ou p190A). Le gène ARHGAP35 codant pour cette protéine est significativement muté dans le cancer (notamment le cancer de l'endomètre) et l'analyse de mutations retrouvées dans les tumeurs a permis de montrer une migration aléatoire des cellules (Lawrence et al. Nature. 2014 ; Binamé, Bidaud-Meynard et al. JCB. 2016). L'équipe a récemment découvert le PLS (« Protrusion Localization Sequence ») comme étant la région minimale responsable de la localisation au niveau des lamellipodes (structures impliquées dans la migration cellulaire) et de la fonction de régulation de RhoA de la protéine (Binamé, Bidaud-Meynard et al. JCB. 2016). La recherche de protéines partenaires du PLS par un criblage double-hybride a fourni une liste d'une cinquantaine de protéines. Ainsi la protéine Kif2A a été retrouvée parmi les protéines candidates. Cette dernière est une kinésine qui joue un rôle dans la cytokinèse et qui a été identifiée dans une étude comme étant potentiellement en lien avec p190A lors de cette étape de la mitose (Manukyan et al. Chromosoma, 2018). Mon objectif est donc de vérifier l'interaction entre p190A et Kif2A afin, à terme, de mieux comprendre le rôle et la régulation de p190A lors de la mitose.

BORDEAUX • France

03/06/2019 → 27/09/2019

Inserm 



Study of the interaction between p190A and Kif2A kinesin.

Cytoskeleton plays an essential role in many physiological mechanisms, including cell division. Indeed, during cytokinesis, actin remodeling allows the formation of two daughter cells. This phenomenon is strongly regulated by RhoGTPases. Among them, RhoGTPase RhoA is mainly controlled by GAP (« GTPase Activating Protein ») p190RhoGAP-A (or p190A). The ARHGAP35 gene encoding p190A is significantly mutated in cancer (especially endometrial cancer) and the functional analysis of mutations found in tumors showed an impact on cell migration (Lawrence et al. Nature. 2014 ; Binamé, Bidaud-Meynard et al. JCB. 2016). The team recently discovered PLS ("Protrusion Localization Sequence") as the minimal region responsible for the localization at lamellipodia (structures involved in cell migration) and required for the GAP function of the protein (Binamé, Bidaud-Meynard et al. JCB. 2016). The research of PLS partner proteins using a double hybrid screening provided a list of about 50 proteins. Thus, the Kif2A protein was found among the candidates. Kif2A is a kinesin that plays a role during cytokinesis and has been identified in a study as potentially related to p190A in this stage of mitosis (Manukyan et al., Chromosoma, 2018). My objective is therefore to verify the interaction between p190A and Kif2A in order to better understand the role and the regulation of p190A in mitosis.



Pauline FISCH

Investigation du rôle de la calmoduline et du domaine C-terminal du canal calcique de type L dans les arythmies cardiaques.

L'équipe de recherche examine le lien entre les mutations d'une Calcium-Modulated protein, appelée calmoduline (CaM), et certaines maladies cardiovasculaires. La CaM est une calmoduline ubiquitaire capable de lier quatre ions Ca^{2+} . Lorsqu'elle fixe le calcium, sa conformation change lui permettant de se lier à ses cibles. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, en particulier dans le cycle du calcium des cellules contractiles du cœur. La CaM interagit notamment avec un canal de type L laissant entrer le calcium dans la cellule. La CaM se lie à différents domaines de ce canal afin de réguler son ouverture et sa fermeture. Le domaine C terminal de ce canal, représenté par un peptide C, ainsi que deux mutants de la CaM (Q136P, E141G) ont été étudiés lors de ce stage.

Après la production et la purification des protéines CaM, différentes techniques de caractérisation ont été réalisées afin de déterminer l'effet des mutations sur la structure et les fonctions de la CaM.

Deux techniques ont été utilisées pour comparer la stabilité des CaM. La stabilité face à la digestion enzymatique Asp-N de la CaM seule ou liée à ses cibles a été testée. Grâce au dichroïsme circulaire, la stabilité en fonction de l'augmentation de la température a été mesurée.

Afin de déterminer les changements structuraux entre les CaM, deux techniques d'analyses ont été réalisées. Le dichroïsme circulaire a permis de déterminer la proportion des différentes structures secondaires des CaM. Des spectres RMN ont permis d'apporter des informations quant aux changements structuraux tertiaires des protéines mutées ainsi que sur les complexes protéine-peptide C.

Enfin des paramètres thermodynamiques caractérisant la liaison entre le peptide C et la CaM ont été déterminés grâce à la modélisation de spectres d'ITC. Cela a apporté des informations sur le type de liaison, l'affinité et la stœchiométrie de chaque interaction CaM-peptide.

Cette étude a montré que les mutations impactent fortement sur les structures secondaires et tertiaires et sur les paramètres thermodynamiques. Ces changements peuvent empêcher la correcte régulation du calcium dans la cellule, et donc causer ces maladies cardiovasculaires.



Investigating the role of calmodulin and its interaction with the C terminal domain of L-type calcium channels in cardiac arrhythmia.

The research team is exploring the link between mutations of a calcium-modulated protein, called calmodulin (CaM), and certain cardiovascular diseases. CaM is a ubiquitous calmodulin capable of binding four Ca^{2+} ions. When it fixes calcium, its conformation changes allowing it to bind to its targets. It is involved in many physiological processes, particularly in the calcium cycle of contractile cells of the heart. CaM interacts with an L-type calcium channel that allows calcium to enter into the cell. CaM binds to different areas of this channel to regulate its opening and closing. Two mutants of CaM (Q136P, E141G), and their interaction with one of the key CaM binding domains on the channel, represented by a C peptide, were studied during this internship.

After production and purification of CaM proteins, various characterization techniques were performed to determine the effect of mutations on CaM structure and functions.

Two techniques were used to compare the stability of CaM. The stability against Asp-N enzymatic digestion of CaM alone or bound to its targets was tested. Additionally, circular dichroism was used to measure the stability as a function of the increase in temperature.

In order to determine structural changes between wild-type and mutant CaM, two analytical techniques were performed. Circular dichroism made it possible to determine the proportion of different secondary CaM structures. NMR spectra provided information on the tertiary structural changes of the mutated proteins as well as on the protein-C peptide complexes.

Finally, thermodynamic parameters characterizing the binding between the C peptide and the CaM were determined by isothermal titration calorimetry. This provided information on the type of binding, affinity, and stoichiometry of each CaM-peptide interaction.

This investigation has found that mutations have a strong impact on secondary and tertiary structures and on thermodynamic parameters of binding to the C domain of the L-type calcium channel. These changes may prevent the proper regulation of calcium in the cell, thus increasing the risk of cardiac arrhythmias in patients with these mutations.



Léontine FLORET

UCB

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

Les anticorps thérapeutiques : étude des différences entre agrégats "natifs" et agrégats induits par stress thermique.

L'objectif du projet était de comprendre et caractériser les différences entre agrégats "natifs" et agrégats provoqués par stress thermique chez les anticorps thérapeutiques. La température est considérée comme un facteur environnemental critique qui peut engendrer l'agrégation et ainsi diminuer l'activité biologique des anticorps voire même induire une réponse auto-immunitaire. Trois échantillons du même anticorps ont été conservés soit au réfrigérateur (-70 °C) soit dans des incubateurs à température élevée (37 ou 50 °C) pendant un mois puis ont d'abord été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique afin d'en concentrer et d'isoler les dimères. Ensuite, les échantillons de dimères obtenus ont été caractérisés : leur pureté a été étudiée à l'aide d'une électrophorèse SDS-page, des expériences de dichroïsme circulaire et d'infrarouge couplés à la transformée de Fourier ont permis de déterminer leur structure secondaire, des études quantitatives de la transition bimoléculaire ont été menées pour étudier leur structure tertiaire et leurs dynamiques conformationnelles et enfin, leur affinité et caractéristiques cinétiques avec un ligand spécifique ont été étudiées grâce à des expériences de résonance plasmonique de Surface (SPR). Parallèlement, une étude sur la réversibilité de l'agrégation a été menée. Les dimères purifiés ont été conservés soit au réfrigérateur (2-8 °C) soit dans un incubateur (37 °C) et durant 11 semaines les échantillons ont été analysés régulièrement par chromatographie liquide d'exclusion stérique à haute performance. Des expériences supplémentaires au cours desquelles les dimères ont été mélangés avec des monomères à une concentration finale de 20 % ont été menées comme ci-dessus, et l'agrégation a été étudiée au cours du temps comme précédemment.

Il a été démontré que les dimères formés par stress thermique sont structurellement différents de dimères formés naturellement. De plus, les dimères induits par la chaleur sont plus stables au cours du temps que ceux formés naturellement. Cette étude démontre que les facteurs environnementaux peuvent altérer les voies d'agrégation des anticorps, et qu'une structure hautement organisée de dimères peut impacter leur stabilité au cours du temps.

Une étude complémentaire sur le même anticorps a été démarrée pour comparer la taille et les caractéristiques conformationnelles d'espèces de haut et bas poids moléculaires (L/HMWS) issues de deux échantillons de départ obtenus lors de deux procédés différents. Le temps imparti n'a permis que de purifier ces L/HMWS et de faire une expérience de résonance plasmonique de surface. Cette étude doit donc être poursuivie.

SLOUGH • Royaume-Uni

05/06/2019 → 23/09/2019



Understanding the differences between "native" and stress (heat) induced aggregates of therapeutic antibodies.

The project aimed to understand and characterise the differences between native and heat stressed aggregates of therapeutic antibodies. Temperature is considered as a critical environmental factor that can lead to aggregation, which can decrease biological activity of antibodies or even lead to immune responses. Three identical antibody samples that were stored either in the freezer (-70 °C) or in incubators at elevated temperature (37 or 50 °C) for one month were first purified by size exclusion chromatography to concentrate and isolate the dimers. Then, the obtained dimers samples were characterised: their purity was studied by SDS-page electrophoresis, circular dichroism and Fourier Transform Infrared assays enabled to assess their secondary structure, Quantitative understanding of bimolecular edge shift assays were performed to study their tertiary structure and conformational dynamics and eventually, their affinity and kinetics with a specific ligand were studied using surface plasmonic resonance (SPR). In addition, a study focused on the reversibility of protein aggregation was performed. The purified dimers were stored either in the fridge (2-8 °C) or in the incubator (37 °C) and over the course of 11 weeks the samples were analysed by Size exclusion High performance liquid chromatography. Additional experiments in which dimers were added to monomers at a concentration of 20% were performed as above, and aggregation studied over time as described above.

It was shown that dimers obtained by heating stress are structurally different from native dimers. In addition, heat induced dimers are more stable over time compared to the native dimers. This study demonstrates that environmental factors can alter the aggregation pathways of antibodies, and that the higher order structure of dimers can impact their stability over time. An extra study on the same antibody was started to compare size and conformational characteristics of low and high molecular weight species (L/HMWS) from two starting material from two different processes. The given time only enabled to purify LMWS and HMWS and to perform an SPR assay. This study has to be pursued.



**Clémence
FOURNIER**

IMMUNOCORE UK

Tuteur(s) / Supervisor(s): Dan BLAT

Impact of the half-life of ImmTAC® sur la fenêtre thérapeutique.

Chaque année, de plus en plus de personnes sont atteintes de cancers et trouver un traitement efficace est une priorité dans le domaine du médical. Immunocore Limited développe des ImmTAC® (Immune mobilising monoclonal TCRs against cancer), molécules bispécifiques comportant un TCR et un anti-CD3. Ces molécules permettent de renforcer la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses, en liant d'une part leur TCR à très haute affinité au peptide cible exprimé par ces cellules et d'autre part leur anti-CD3 aux lymphocytes T effecteurs.

Mon projet a été de déterminer quel était l'impact de la demi-vie de fixation des ImmTAC® à leur complexe peptide-HLA sur l'efficacité et la puissance de ces molécules thérapeutiques. Le résultat est directement lié à la concentration des molécules qui pourraient plus tard être administrées aux patients. En effet, un ImmTAC® peut mettre un certain temps à atteindre sa cible in vivo, et il faut que sa puissance et son efficacité soient toujours suffisamment conséquentes. De la même façon, le projet a aussi permis l'étude de l'effet de cette demi-vie sur la possible cross-réactivité des ImmTAC®, afin de déterminer comment limiter la mort de cellules saines.

Pour répondre à ces objectifs de recherche, le projet a majoritairement nécessité des ELISA sandwich pour mesurer le taux d'interféron gamma sécrété par les lymphocytes T effecteurs, activés par les ImmTAC®. Dans une moindre mesure, une caractérisation de la lignée cancéreuse utilisée a été réalisée via une PCR, un séquençage, une expérience de cytométrie de flux et un Western Blot

Oxfordshire • Royaume-Uni

08/06/2019 → 06/09/2019

IMMUNOCORE
targeting T cell receptors



Impact of the half-life of ImmTAC® Molecules on Therapeutic Window.

Every year, more and more new cancer cases are diagnosed over the world, and finding a cure is a priority in health domain. Immunocore Limited develops ImmTAC® (Immune mobilising monoclonal TCRs against cancer) which are bi-specific biologics combining a TCR with an anti-CD3 effector. These molecules are able to reinforce the immune response against cancer cells, by binding on the one hand to the target peptide expressed on cancer cells with their high affinity TCR, and on the other hand to T-cells effectors with their anti-CD3.

My project aimed to determine the impact of ImmTAC® binding half-life on potency and efficiency of these therapeutic molecules. Results are directly linked to the concentration of molecules which could later be administered to patients. An ImmTAC® can indeed take a certain amount of time before reaching its target in vivo, and its potency and efficiency still must be high enough. In the same way, the project also enabled to study the impact of this binding half-life on the possible cross-reactivity of ImmTAC®, to determine how to limit the death of healthy cells.

To fulfil these research aims, the project mainly involved IFN γ ELISA to measure the amount of IFN γ secreted by T-cells previously activated by ImmTAC®. To a lesser extent, we also characterized the used cancerous cell line with a PCR, sequencing, Flow Cytometry and Western Blot.



Oriane GARCIA

INRS-IAF

Tuteur(s) / Supervisor(s): Jean-François NAUD

Détection du dopage chez les athlètes : hormone de croissance, EPO et mesures de paramètres sanguins .

Le laboratoire de contrôle du dopage de l'INRS Armand Frappier de Laval (Canada) fait partie des 31 laboratoires dans le monde accrédités dans la lutte contre le dopage. La détection de produits ou méthodes considérés comme dopants par l'Agence Mondiale Antidopage sont réalisés sur des échantillons d'urine et de sang provenant de sportifs qu'ils soient en compétition ou hors compétition. Au total 11 procédures sont réalisées dans ce laboratoire : 4 dans le secteur biologique et 7 dans le secteur chimique. J'ai intégré l'équipe de biologie du laboratoire afin d'apprendre à maîtriser les méthodes de détection de l'érythropoïétine (EPO) et de l'hormone de croissance (GH) par méthode directe ou indirecte. La détection de l'EPO repose sur la méthode du Western Blot alors que la détection de la GH repose sur des techniques d'immunodétection. Mon travail durant ce stage consistait à la réception des colis, l'enregistrement des échantillons et à la réalisation des procédures selon la demande du client (institutions, fédérations sportives ou événements sportif). Les techniques de laboratoire auxquelles j'ai été formée doivent être conformes aux protocoles validés en interne par le laboratoire mais également par l'Agence Mondiale Antidopage. De plus, il s'agit d'être capable d'analyser les résultats afin d'émettre un verdict et/ou de réaliser des confirmations supplémentaires. Au final, les résultats seront validés par un superviseur avant qu'un certificat ne soit émis par le laboratoire pour le client.

LAVAL • Canada

03/06/2019 → 02/10/2019

INRS
UNIVERSITÉ DE RECHERCHE



Detection of doping of athletes : growth hormone, erythropoietin and measure of blood parameters.

The doping control laboratory of INRS Armand Frappier of Laval (Canada) is one of the 31 laboratories in the world accredited by the world anti-doping agency (WADA). The detection of drugs or methods considered as doping are performed on urine or blood samples. These samples come from athletes in or out of competition.

A total of 11 procedures are performed in this laboratory : 4 in the biological sector and 7 in the chemical sector. I joined the biology team to learn detection's methods of erythropoietin (EPO) and growth hormone (GH) by direct or indirect method. The detection of EPO is based on a Western Blot while the detection of GH is based on immunodetection tests. My work during this internship consisted of the cool boxes reception, the registration of the samples and the implementation of the biological procedures according to the client's request (institutions, sports federations or competitions). Laboratory techniques must be in keeping with protocol approved inside the laboratory but also by the world anti-doping agency. Moreover, I should be able to analyze the results in order to give a verdict and / or to make additional tests. In the end, the results will be validated by a supervisor before the emission of a certificate.



Robin GERARDIN

INOTREM

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Kévin CARRASCO**

Caractérisation de la liaison d'anticorps sur leur cible par cytométrie en flux et test ELISA.

Certains immunorécepteurs exprimés par des cellules de l'immunité innée sont connus pour amplifier la réponse inflammatoire initiée par les Toll-like Receptors. La réponse inflammatoire résultante peut être problématique lorsqu'elle est exacerbée comme, par exemple, dans le choc septique (pathologie aigüe) ou les MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales). La société INOTREM est consacrée à l'étude de ces récepteurs et au développement d'inhibiteurs pharmacologiques à même d'atténuer leur action pro-inflammatoire. Dans le but de cibler des pathologies inflammatoires chroniques, INOTREM a lancé un projet « ANTICORPS », reposant sur des anticorps chimériques (mAbs et Fabs) dirigés contre l'un de ces récepteurs. Le travail effectué au cours de ce stage a principalement consisté à trier diverses IgG1, ainsi que les Fabs correspondants, en fonction de leur affinité pour leur cible. Deux méthodes analytiques simples ont été mises au point in situ afin de pouvoir estimer cette affinité rapidement et efficacement. Tout d'abord, la liaison ou « binding » de ces anticorps sur leur cible a été mesurée par cytométrie en flux, en les utilisant pour marquer des cellules primaires (neutrophiles humains) ou des lignées cellulaires (monocytes) exprimant le récepteur en question à divers degrés. Dans un deuxième temps, un test ELISA a été mis au point afin de renforcer et de confirmer les résultats des tests de cytométrie en flux susmentionnés, et d'évaluer l'affinité de chaque anticorps ou Fab pour l'immunorécepteur étudié de manière plus sensible et spécifique. Ces données ont ensuite été mises en parallèle avec celles de tests fonctionnels issus de la plateforme de screening d'INOTREM (réalisés en dehors du cadre de ce stage). Collectivement, les résultats de ces tests ont mis en évidence un certain nombre de candidats prometteurs, ayant démontré une forte affinité pour leur cible, ainsi qu'un effet antagoniste sur sa fonctionnalité. De tels anticorps pourraient prochainement faire l'objet d'études approfondies afin de mieux caractériser leur comportement de liaison et préciser leur mode d'action, ainsi que des travaux d'optimisation de séquence afin d'améliorer encore leurs performances.

Vandoeuvre les Nancy • France

03/06/2019 → 30/08/2019



Characterization of the binding of antibodies on their target by flow cytometry and Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

Several immune receptors expressed on innate immune cells have been characterized as amplifiers of the inflammatory response initiated by Toll-like Receptors. This response can prove harmful when exacerbated, as is, for instance, the case with acute pathologies such as septic shock, or chronic diseases such as IBD (Inflammatory Bowel Diseases). INOTREM is dedicated to the study of such receptors and the development of pharmacological inhibitors capable of curbing their pro-inflammatory action. In order to target chronic inflammatory diseases, INOTREM has launched an "ANTIBODY" project centered around the development of chimeric antibodies (mAbs and Fabs) directed against one of these receptors. The work carried out over the course of this internship mostly consisted in sorting out various IgG1, as well as the correspond Fabs, according to their affinity for this receptor. Two simple analytical methods were devised on-site in order to evaluate this affinity rapidly and efficiently. Initially, the binding of these antibodies on their target was measured by flow cytometry, using them to label primary cells (human neutrophils) or cell lines (monocytes) known to express this receptor to varying degrees. In a second time, an ELISA test was developed in order to strengthen and confirm the results of the aforementioned flow cytometry assays, and gauge the affinity of each antibody or Fab for the receptor in a more sensitive and specific manner. In parallel, functional assays were carried out by the screening platform of INOTREM, outside the scope of this internship. Altogether, the results of these tests highlighted a number of promising candidates, that demonstrated a strong affinity for their target, as well as an antagonistic effect on its functionality. Such antibodies may in the near future be subjected to in-depth studies in order to further characterize their binding behavior and unravel their precise mode of action, as well as sequential optimization studies in order to further improve their performances.



Mathias GERBIER

FANTO LAB

Tuteur(s) / Supervisor(s): Manolis FANTO

Agrégation de poly-proline-arginine et mort neuronale impliqués dans la sclérose amyotrophique latérale et la démence fronto-temporale.

La sclérose amyotrophique latérale (ALS) et la démence frontotemporale (FTD) sont deux désastreuses maladies neurodégénératives. Les deux maladies font partie du même spectre clinique car la cause la plus fréquente de ces 2 pathologies est une expansion de séquences répétées d'hexanucléotides GGGGCC (G4C2) dans l'intron 1 du chromosome 9 cadre ouvert de lecture 72 (C9orf72). Cette séquence mutée est traduite en 5 différentes protéines à dipeptides répétés (DPR). Poly-proline-arginine (PR) est la plus neurotoxique et il a été montré qu'elle peut provoquer des déformations de la lamina nucléaire (Lamine B1). Cette distorsion du noyau, liée au déplacement de la protéine nucléaire Lamine B1, est une des caractéristiques d'une nouvelle forme de mort cellulaire, récemment nommée karyoptosis. Ce phénomène non apoptotique a été observé dans plusieurs maladies neurodégénératives et est lié à une dérégulation de l'autophagie. Ici nous nous concentrons sur les protéines poly-PR et étudions leur rôle, ainsi que leur potentiel lien avec la karyoptosis, dans le cadre de la maladie C9 ALS/FTD. Nous avons observé l'agrégation de protéines à répétitions PR et investigué la présence de caractéristiques de la karyoptosis et de marqueurs de mort cellulaire. Pour cela, on a utilisé un modèle Drosophile de la maladie C9 ALS/FTD exprimant des protéines étendues poly-PR à 64 répétitions (avec tag HA) et une lignée contrôle exprimant des protéines poly-PR à 8 répétitions (avec tag HA). Lorsque les mouches exprimant PR64 atteignent le stade final de la maladie, les cerveaux des deux génotypes ont été disséqués et des colorations par immunofluorescence, avec des anticorps anti-Lamine B, anti-HA, et anti-caspase 1, ainsi que des tests de mort cellulaire (TUNEL technology), ont été effectués. Ensuite, nous avons généré des images avec un microscope confocal inversé et réalisé des analyses de circularité nucléaire. Les résultats montrent que l'expression de protéines poly-PR étendues entraîne des déformations du noyau et une mort cellulaire non apoptotique. Par conséquent, la karyoptosis causé par des protéines poly-PR pourrait être le mécanisme de mort cellulaire intervenant dans la maladie C9 ALS/FTD.

LONDON • Royaume-Uni

03/06/2019 → 30/08/2019



Poly-proline-arginine aggregation and neuronal cell death in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD) are 2 catastrophic neurodegenerative diseases. These two diseases are part of the same clinical spectrum (C9 ALS/FTD) as the most common cause of both of them is an expansion of GGGGCC (G4C2) hexanucleotide repeats in intron 1 of chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72). This mutated sequence is translated into 5 different expanded dipeptide-repeat proteins (DPR). Poly-proline-arginine (PR) DPR is most neurotoxic and has been shown to cause nuclear lamina (LaminB1) deformation. This nucleus distortion, linked to movements of nuclear lamina protein LaminB1, is a hallmark of a novel form of cell death, recently described as karyoptosis. This non-apoptotic phenomenon has been observed in several neurodegenerative disorders and is linked to deregulation of autophagy. Here we focused on poly-PR DPR and studied its role, as well as its potential link with karyoptosis, in C9 ALS/FTD. We observed PR DPRs aggregation and investigated presence of karyoptosis features and cell death markers in the context of this disease. To this goal, we used a Drosophila model of C9 ALS/FTD expressing expanded poly-PR proteins with 64 repeats (HA-tagged) and a control line expressing PR proteins with 8 repeats (HA-tagged). When flies expressing PR64 had reached the end stage of the disease, we dissected brains of both genotypes and carried out immunofluorescence staining with anti-LaminB, anti-HA, and anti-caspase 1 antibodies and performed cell death detection assay (TUNEL technology). Subsequently we generated images using inverted confocal microscopy and carried out nuclear circularity analysis. The results show that expanded poly-PR protein expression leads to nucleus deformation and non-apoptotic cell death. Therefore, PR-triggered karyoptosis could be the mechanism of cell death occurring in C9 ALS/FTD disease.



Sasha Lizbeth GOMEZ

COVALX ANALYTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): Alexis NAZABAL

Analyse de complexes protéiques non-covalent par spectrométrie de masse.

Pendant le processus de développement des médicaments l'étape analytique joue un rôle vital pour pouvoir vérifier ainsi que mieux comprendre la molécule produite, de nombreuses analyses sont effectuées pendant l'étape de développement généralement au sein de l'entreprise et parfois de façon externe lorsque les ressources ne sont pas disponibles.

CovalX est devenu le leader mondial dans le domaine des services des epitope mapping et analyses de complexes protéiques, grâce à l'invention d'un détecteur adaptable à un spectromètre de masse MALDI ToF qui fait possible la détection de hautes masses, jusqu'à 2 Mega daltons.

Ces analyses permettent aux entreprises pharmaceutiques de vérifier la compatibilité de ses complexes protéiques ainsi que découvrir le site d'interaction entre eux.

Passionnée par le domaine analytique, mon travail au cours de ce stage a consisté principalement à des analyses haute masse appuyées avec le détecteur Covalx qui sert à vérifier l'intégrité de la molécule, possible multimerisation ou agrégations ainsi que la compatibilité du complexe protéique, et epitope mapping par XL-MS appuyé sur un Nano LC orbitrap le complexe protéique est stabilisé et digéré avec différentes enzymes ensuite ces peptides sont analysés, l'absence ou présence de l'anticorps entraîne une différence des peptides, grâce à cette différence il est possible de détecter le site d'interaction de l'antigène avec l'anticorps.

BORDEAUX • France

09/05/2019 → 14/09/2019



Analysis of non-covalent protein complexes by mass spectrometry.

During the drug development process the analytic step plays a vital role being able to verify as well as better understand the molecule produced, innumerable analyzes are performed during the development stage usually within the company and sometimes externally when the resources are not available.

CovalX has become the world leader in the field of epitope mapping and protein complex analysis services, thanks to the invention of a detector adaptable to a MALDI ToF mass spectrometer which makes possible the detection of high masses, up to 2 Mega daltons. These analyzes allow pharmaceutical companies to check the compatibility of their protein complexes and discover the site of interaction between them.

Passionate about the field of analysis, my work or course of this internship consisted mainly of high mass analyzes supported with the Covalx detector which serves to check the integrity of the molecule, possible multimerization or aggregations as well as the compatibility of the protein complex, and epitope mapping XL-MS supported on a Nano LC orbitrap the protein complex is stabilized and digested with different enzymes in sequence these peptides are analyzed, the absence or presence of the antibody causes a difference of the peptides founds, thanks to this difference is possible the detection of the site of interaction of the antigen with the antibody.



Elise GOURIOU

CONFO THERAPEUTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Lies DEKEYZER**

Développement d'un test de criblage à haut débit pour la découverte d'anticorps.

Confo Therapeutics est une société en pleine croissance qui dispose d'une technologie unique et exclusive pour développer des médicaments ciblant les récepteurs RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) là où d'autres ont échoué. En raison de leurs nombreux rôles physiologiques et des récents progrès de la cristallographie des RCPG, l'industrie pharmacologique s'intéresse de plus en plus à ces récepteurs. Ces récepteurs signalent à travers différents effecteurs lors de la liaison d'un ligand agoniste, suggérant ainsi de multiples états actifs spécifiques à chaque ligand. Ces conformations actives sont instables sans la présence d'un partenaire spécifique de signalisation cytosolique. Néanmoins, il a été démontré que les fragments d'anticorps de camélidés sont des outils efficaces pour stabiliser les RCPG actifs. Ces fragments sont générés via l'immunisation de Lamas et seuls ceux qui présentent des caractéristiques de liaison spécifiques sont sélectionnés lors d'un processus de criblage. Mon stage était axé sur le développement d'un test de criblage alternatif aux tests utilisés actuellement chez Confo Therapeutics. L'objectif était de développer un test à haut débit, homogène, robuste et sensible. Dans ce but, un test de détection de proximité a été mis au point et trois approches ont été explorées, ainsi que différents ordre d'addition des réactifs et/ou des schémas d'incubation. Selon l'approche, différents éléments étaient nécessaires. En conséquence, des membranes exprimant un RCPG ont été préparées à partir de cellules transfectées, des fragments d'anticorps marqués de façon spécifique ont été générés à l'aide de la technologie de clonage. Finalement, seule l'une des approches testées a permis de révéler le recrutement d'un fragment d'anticorps par le RCPG. Ce nouveau test ouvre de nouvelles perspectives pour l'identification d'anticorps spécifiques pour les RCPGs.

GHEANT / Zwijnaarde • Belgique

03/06/2019 → 27/09/2019



Development of a high throughput screening assay for antibody discovery..

Confo Therapeutics is a growing company that has a unique and proprietary technology to develop GPCR (G protein coupled receptor) targeting drugs where others have failed. Due to their numerous physiological roles and to recent advances in GPCR crystallography, the interest of pharmaceutical industry for these receptors has increased. GPCR receptors signal through different effectors upon agonist ligand binding suggesting multiple ligand-specific active states. However, these active-state conformations are unstable without any specific cytosolic signaling partners. Nonetheless it has been shown that camelid antibody fragments are effective tools for stabilizing active GPCR. These antibody fragments are generated through immunization of a Llama and only those which present specific binding characteristics are selected during a screening process. The focus of my internship was on the development of an alternative screening assay for the ones used currently at Confo Therapeutics. It was aimed to develop a high throughput, homogeneous, robust and sensitive assay. To this end, a proximity sensing assay has been developed and three approaches were explored as well as different order of addition of the reagents and/or incubation schemes. Depending on the approach, different materials were needed. As a consequence, membranes expressing the target GPCR were prepared from transfected cells, antibody fragments fused to specific tags were generated using cloning technology and antibodies were labelled. Eventually, for only one of the approaches tested, binding of an antibody fragment to the related GPCR could be detected. This result opens up perspectives for implementation of this assay during antibody discovery on therapeutic GPCR targets.



Alice GRIERE

Laboratoire URBE Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Catherine MICHAUX**

Purification et caractérisation de la protéine membranaire PcoB.

L'objectif de mon stage est d'étudier la protéine membranaire PcoB, présente chez la bactérie *Caulobacter crescentus* et dont le rôle suspecté est de participer à un mécanisme d'efflux des ions cuivre (II). Ce processus est intéressant car il pourrait expliquer l'apparition d'un phénomène de résistance des bactéries au cuivre. La protéine PcoB est d'abord purifiée par IMAC (chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés) à partir de corps d'inclusion. Elle est ensuite renaturée par une méthode mise au point par le laboratoire CPB (Chimie Physique des Biomolécules) de l'Université de Namur, associant un détergent, le SDS (Sodium Dodécyle-Sulfate), et un cosolvant, le MPD (2-méthyl-2,4-pentanediol). Cette renaturation est suivie par spectroscopie de fluorescence intrinsèque aux acides aminés tryptophane et tyrosine et par spectroscopie de dichroïsme circulaire. Afin de mettre en évidence une interaction entre PcoB et les ions cuivre (II), des mesures de fluorescence de PcoB renaturée avec différentes concentrations en ions cuivre (II) sont réalisées : une extinction de fluorescence (quenching) est observée. L'état oligomérique de PcoB est ensuite évalué par l'intermédiaire de gels d'électrophorèse natifs, de mesures de DLS (diffusion dynamique de la lumière) et par chromatographie d'exclusion stérique. Enfin, dans une dernière partie visant à étudier l'activité de la protéine, des liposomes de POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) sont formés afin de tenter de reproduire un environnement proche de l'environnement natif de la protéine membranaire. Des tests de relargage de la calceïne, un composé fluorescent, sont réalisés afin de voir s'il est possible d'encapsuler une telle molécule dans les liposomes de POPC.

NAMUR • Belgique

03/06/2019 → 20/09/2019



Purification and characterization of the PcoB membrane protein.

The aim of my internship is to work on the membrane protein PcoB, which is located in *Caulobacter crescentus* bacteria and whose the function is supposed to be a copper (II) efflux-pump. This mechanism is interesting because it could explain the appearance of copper resistance in bacteria. First of all, the PcoB protein is purified by IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) using inclusion bodies. Then, it is refolded with a house-made method from the CPB (Biomolecules' Chemistry and Physics) laboratory from the University of Namur which associates the SDS detergent (Sodium Dodecyl Sulfate) with the MPD cosolvent (2-methyl-2,4-pentanediol). This refolding is followed by tryptophan and tyrosine amino acids intrinsic fluorescence spectroscopy and by circular dichroism. Fluorescence measurements of refolded PcoB with different copper (II) ions concentrations are done to highlight the interaction between PcoB and copper (II) ions and a quenching of fluorescence is underlined. Furthermore, the oligomerization state of PcoB is evaluated by using native gels electrophoresis, DLS (Dynamic Light Scattering) and size exclusion chromatography. Finally, in the last part which aims to study the protein activity, POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) liposomes are prepared to reproduce a natural membrane protein environment. Calcein (a fluorescent compound) release assays are experienced to see if it is possible to encapsulate such a molecule in POPC liposomes.



Lise HARTMANN

PLANTFORM CORPORATION

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Doug COSSAR**

Purification d'un bio-fixateur naturel, la butyrylcholinestérase, et analyse de ses profils de N-glycosylations.

PlantForm est une entreprise biopharmaceutique dont l'activité est centrée sur le développement et la production de protéines thérapeutiques à partir de plants de tabac, notamment à partir de *Nicotiana benthamiana*. Leur technologie vivoXPRESS® permet une expression transitoire des protéines en infiltrant les feuilles des plants de tabac avec des souches d'*Agrobacterium* au préalable génétiquement modifiées avec le gène codant pour la protéine voulue. Pendant ce stage, j'ai eu l'opportunité de travailler sur la purification à grande échelle de l'un de leur produit biopharmaceutique, la butyrylcholinestérase, un bio-fixateur naturel qui se lie de manière spécifique et irréversible aux agents neurotoxiques, poisons notamment utilisés par les armées et le terrorisme. Sa purification se fait en trois étapes : une colonne d'interaction hydrophobe (Phenyl), une échangeuse d'anions (Capto Q) et enfin une d'affinité (HuPrine). Après chaque purification, la pureté des échantillons a été analysée sur des gels SDS-PAGE et l'activité hydrolase de l'enzyme purifiée a été mesurée par le test d'Ellman. Une autre partie de mon travail a été l'élaboration d'une méthode de purification à petite échelle plus rapide, de manière à obtenir la butyrylcholinestérase avec une pureté suffisante permettant des analyses complémentaires, comme l'identification de ses profils de N-glycosylations. A cette échelle, cette purification a été réalisée sur colonnes ouvertes avec les billes appropriées. Un Western Blot anti-butrylcholinestérase a été réalisé afin de confirmer l'expression de l'enzyme. Enfin, cette nouvelle méthode de purification à petite échelle a été utilisée pour réaliser une glyco-préparation de la butyrylcholinestérase afin d'identifier les différentes glyco-formes obtenues à partir de quatre méthodes de production différentes. Ceci s'inscrit dans un projet dont le but est de trouver le procédé produisant la forme glycosylée désirée avec un temps de demi-vie dans le système sanguin le plus long possible. Un Western Blot anti-butrylcholinestérase a été réalisé afin de confirmer que chaque méthode de production permet l'expression de l'enzyme et un Western Blot anti-RCA (*Ricinus communis* agglutinin I) a permis de révéler la présence ou non de galactose. Pour faire la glyco-préparation, la N-glycanase a été ajoutée aux échantillons de butyrylcholinestérase purifiés dans le but de détacher les glycanes de l'enzyme. Les glycanes ont ensuite été injectés sur une colonne TSK gel Amide-80 d'interaction hydrophile en chromatographie liquide et identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de glycanes déjà connus.

GUELPH • Canada

10/06/2019 → 10/10/2019



Purification of a bioscavenger, butyrylcholinesterase, and analysis of its N-glycan profiles.

PlantForm is a biopharmaceutical company focused on the development and the production of therapeutic proteins using tobacco plants, notably *Nicotiana benthamiana*. Their vivoXPRESS® platform enables transient protein expression by infiltrating plant leaves with *Agrobacterium* strains genetically modified with the desired protein gene sequence. During this internship, I had the opportunity to work on the large scale purification of one of their biopharmaceutical products, butyrylcholinesterase, a bio-scavenger that can specifically and irreversibly bind to nerve agents, compounds notably used in wars and terrorism. The purification process consists of three steps: hydrophobic interaction (Phenyl), anion exchange (Capto Q) and finally affinity chromatography (HuPrine). After each process, sample purity was analyzed on SDS-PAGE and enzyme hydrolase activity measured using the Ellman assay. Another part of my role was to establish a quicker small-scale purification method to produce sufficient butyrylcholinesterase at a purity appropriate for further analyses, including the identification of N-glycan profiles. At this scale, this purification was conducted on open columns with the appropriate beads. A Western Blot anti-butrylcholinestérase was performed to confirm enzyme expression. Finally, this new small-scale purification process was tested to identify different glyco-forms produced from four different butyrylcholinestérase process variants. This is part of a project to identify the desired glyco-form that would stay active the longest time in the bloodstream. A Western Blot anti-butrylcholinestérase was performed to confirm that every process variant enables enzyme expression and a Western-Blot anti-RCA (*Ricinus communis* agglutinin I) was used to reveal the presence of galactose on the glycoprotein. To do the glyco-preparation, N-glycanase was added into purified butyrylcholinestérase samples to separate glycanes from the enzyme. Glycanes were then injected onto a TSKgel Amide-80 Column for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and identified by comparing their retention time to that of known glycan species.



Laura HIDALGO

LONZA BIOLOGICS plc

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Rebecca MICHAEL**

Amélioration d'une plateforme d'expression d'anticorps bispécifiques.

Face à la complexité croissante des produits biologiques et la hausse du marché des anticorps bispécifiques, la R&D de Lonza Biologics a actualisé son système d'expression génique GS Xceed® en créant de nouveaux plasmides pour la construction de vecteurs multi-gènes. Mon projet avec le département Applied Protein Services de Lonza a été d'aider à développer une plateforme d'expression de bispécifiques améliorée qui utilise ces vecteurs multi-gènes. Avec ces nouveaux vecteurs, il est possible de disposer les gènes dans divers ordres et d'utiliser des promoteurs de forces différentes. Le premier objectif du projet a été de savoir comment la disposition des gènes dans ces vecteurs affecte le niveau d'expression. Des protéines fluorescentes ont été utilisées comme rapporteurs pour mesurer l'expression génique. Trois gènes de protéines fluorescentes ont été différemment disposés dans les vecteurs qui ont été transitoirement transfectés dans des cellules CHO. La cytométrie en flux a été utilisée pour mesurer les intensités fluorescentes. La deuxième étape du projet a été de déterminer si transitoirement co-transfecter avec différents ratios de vecteurs mono-gène est un bon moyen de modéliser une transfection avec un vecteur multi-gènes contenant des promoteurs de forces différentes. Pour cela, il a fallu trouver un intervalle de quantités d'ADN permettant de fiablement co-transfecter. Pour ce faire, des CHO ont été co-transfectées avec différentes quantités (décroissantes et croissantes) de vecteurs porteurs d'un gène de protéine fluorescente. Puis, la viabilité cellulaire a été mesurée et les échantillons ont été analysés dans un cytomètre en flux. L'étape suivante a été de co-transfecter des CHO avec différents ratios de vecteurs porteurs d'un gène de protéine fluorescente et d'utiliser la cytométrie en flux afin de savoir si le ratio d'ADN transfecté transparaît dans le niveau d'expression du produit. La dernière étape a été de co-transfecter avec des bispécifiques thérapeutiques, effectuer un suivi qualitatif et quantitatif et déterminer, avec la technique SDS-PAGE, si la qualité/l'assemblage du produit peut être amélioré en changeant les ratios des gènes.

CAMBRIDGE • Royaume-Uni

03/06/2019 → 30/09/2019



Bispecific antibodies expression platform improvement.

With the increasing complexity of biologics and the rapid rise of bispecific antibody market, Lonza Biologics R&D has updated its GS Xceed® Gene Expression System by creating new plasmids for the construction of multi gene vectors. My project with Lonza Applied Protein Services department has been to help develop an improved bispecifics expression platform using the new Multi Gene Vector (MGV) system. This new MGV system allows to put genes in different positions and use different strength promoters. First objective of this project has been to determine whether gene order in MGVs affects expression level. First experiments were conducted with fluorescent proteins used as reporters to measure gene expression. Triple gene vectors (TGVs) containing three individual fluorescent proteins were generated with different gene orders and transiently transfected into CHO cells. Flow cytometry was used to measure fluorescence intensities. Second part of the project has been about finding out if it is possible to model using different strength promoters in multi gene vectors by transiently co-transfecting with different single gene vectors ratios. It required defining a DNA quantity range allowing reliable co-transfections. In order to do so, CHO cells were co-transfected with reducing and increasing amounts of two fluorescent proteins part vectors. Then, cell viability was measured and samples were acquired on flow cytometer. Next step was to determine whether the ratio of fluorescent protein signal (i.e. the ratio of expression) reflects the ratio of part vectors transfected. For that purpose, CHO cells were co-transfected with different ratios of two fluorescent proteins part vectors and flow cytometry was used once again. Final task was to perform co-transfections with therapeutically relevant bispecific molecules, monitor product quality and titre and determine, using SDS-PAGE analysis, whether product quality/assembly can be improved by changing gene ratios.



Charlotte JEANNIN

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Maud DEWAELE**

Amélioration continue au sein du département Quality for Suppliers & Incoming Materials.

GlaxoSmithKline est un des leaders mondiaux de l'industrie pharmaceutique. La société est notamment reconnue pour sa division Vaccines qui assure le développement, la production et la distribution de plus de 2,5 millions de vaccins par jour. J'ai effectué mon stage sur le site de Wavre, en Belgique, qui regroupe les activités globales de GSK Vaccines. Avec sa superficie équivalente à 70 terrains de football, il est considéré comme étant le plus grand site de production de vaccins au monde.

Toutes les activités de GSK Vaccines sont soumises à la politique d'assurance qualité mise en place par le Global Quality Assurance, un des quatre piliers de l'entreprise. J'ai réalisé mon stage au sein du département Quality for Suppliers & Incoming Materials et plus particulièrement au sein de l'équipe en charge de la qualité des produits d'emballage primaire (seringue, tube, flacon) et secondaire (étui, notice, étiquette) et de leurs fournisseurs associés. C'est en étroite collaboration avec plusieurs services de GSK (contrôle qualité, magasin, service approvisionnement et production) que mes différents projets ont été réalisés, avec également un contact avec les fournisseurs d'articles de packaging. Pendant mes trois mois de stage, j'ai participé à des différents projets d'amélioration continue tels que l'optimisation et l'illustration de procédures, l'amélioration de la manutention d'un article spécifique, la revue de l'accord qualité entre GSK et un fournisseur, la rédaction d'un document réservé à la formation du personnel ou encore la collection des données sur les caractéristiques des matières premières. En parallèle, un travail d'apprentissage des différentes réglementations en vigueur et du procédé de production d'un vaccin a été mené.

WAVRE • Belgique

03/06/2019 → 30/09/2019



Continuous improvement in the Quality for Suppliers & Incoming Materials department.

GlaxoSmithKline is a world leader in the pharmaceutical industry. The company is well-known for its Vaccines division which ensures the development, production and distribution of more than 2.5 million vaccines per day. My internship took place in the site of Wavre, Belgium that gathers together global activities of GSK Vaccines. With an area equivalent to the surface of 70 football fields, it is considered as the largest vaccines production site in the world.

All GSK Vaccines' activities are subjected to the quality assurance policy established by the Global Quality Assurance, one of the four mainstays of the company. I did my internship in the Quality for Suppliers & Incoming Materials department and more particularly in the team in charge of the quality of primary (syringe, tube, vial) and secondary packaging (box, leaflet, label) and their associated suppliers.

My different internship missions were performed in close collaboration with several GSK's services (warehouse, provisioning, quality control and production) and in contact with packaging suppliers. I participated to various continuous improvement projects such as optimization and illustration of procedures, improvement of the handling of a specific article, review of the quality agreement between GSK and a supplier, writing of a document for staff training and data collection on incoming materials characteristics. In parallel, a learning work about current regulations and vaccine production process was carried out.



Marie JOYEAU

PACIFIC BIOTECH

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Xavier MOPPERT**

Synthèse de polyhydroxyalcanoates par différentes souches bactériennes de la Polynésie française : étude et valorisation.

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) représentent une catégorie de matières plastiques potentiellement intéressantes, car entièrement biodégradables. Ils sont synthétisés par des bactéries aussi diverses que sont leurs milieux de vie. La société Pacific Biotech isole la plupart de ses souches bactériennes dans les "kopara", écosystèmes marins atypiques de la Polynésie française, et les cultive pour produire et caractériser les PHA. La majorité des polymères de PHA produits est dite à courtes chaînes (PHASCL), assez fragile et rigide ; a contrario, les PHA à moyennes chaînes (PHAMCL) sont plus élastiques et résistants et sont davantage recherchés. Pour obtenir les meilleurs rendements possibles en PHA produits et davantage en PHAMCL, 22 souches, 2 connues pour être productrices de PHAMCL et 20 non encore testées, sont cultivées selon des protocoles établis et adaptés par l'entreprise. Différentes principales sources de carbone, en particulier le glucose et l'huile de coprah qui a un intérêt économique, sont testés en même temps que différents procédés de culture et d'extraction de biomasse et de PHA. Les résultats finaux rendent bien compte de l'efficacité de production de PHAMCL avec le glucose ou le saccharose par les deux premières souches, RA26 et MO1180, et l'intérêt de poursuivre les tests sur MO1180 pour une mise en culture à l'échelle pilote. Concernant les autres souches, la conclusion est plus difficile puisque les techniques utilisées sont différentes; mais globalement, certaines souches sont plus intéressantes que d'autres. Ce stage permet aussi de mettre en évidence la difficulté pour obtenir des résultats en fonction des moyens et donc, la capacité d'adaptation nécessaire face à tout type de problème.

ARUE • France

11/06/2019 → 27/09/2019



Polyhydroxyalkanoates synthesis by different bacterial strains from French Polynesia : study and valorization.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) represent a category of potentially interesting, because completely biodegradable, plastics. They are synthesised by bacteria as various as their life ground. The Pacific Biotech company finds some of bacterial strains in uncommon marine ecosystems of French Polynesia called 'kopara', and grows them to produce and characterize PHAs. Major part of produced PHAs polymers is called small-chain-length PHAs (SCLPHA) and is quite fragile and rigid. On the contrary, medium-chain-length PHAs (MCLPHA) are more elastic and more resistant, and widely wanted. To obtain the best possible yields in produced PHAs and even more in MCLPHA, 22 strains - 2 are known for producing MCLPHA and the 20 others have not been tested yet - are cultivated according to protocols established and adapted by the company. Several main carbon sources, particularly glucose and copra oil which shows economic interest, are tested at the same time as different culture and PHAs and biomass extraction processes are. Final results give full account for MCLPHA production efficiency of the first two strains, RA26 and MO1180 with glucose or sucrose, and reasons why tests on MO1180 for a pilot scale-up should be continued. Concerning the other strains, concluding must be harder as used techniques are different; but on the whole, some strains are more interesting than other. This internship allows difficulty in gaining results with actual mains, and adaptation capacity useful for facing any sort of issue, been highlighted too.



Mathilde LAFOURCADE

UNIVERSITY of BERGEN

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Donald GULLBERG**

Caractérisation de la lignée murine transgénique ITGA11-Cre.

Les fibroblastes sont connus pour jouer un rôle important dans la fibrose tissulaire et le stroma tumoral. L'intérêt de comprendre les mécanismes impliqués dans ces conditions pathologiques est grandissant. Similairement, l'intégrine $\alpha 11\beta 1$, spécifique aux fibroblastes, reçoit une attention croissante concernant le processus de cicatrisation de plaie et la fibrose, conditions pour lesquelles l'intégrine $\alpha 11\beta 1$ pourrait être utilisée comme un biomarqueur spécifique aux fibroblastes. Afin d'évaluer l'importance des fibroblastes, une lignée de souris transgénique ITGA11-Cre, dont l'expression est restreinte aux fibroblastes, a été générée pour identifier l'origine de lignées cellulaires et pour déléter des gènes lorsque l'expression de l'intégrine $\alpha 11$ est induite. Après avoir croisé cette lignée transgénique avec la souris rapporteuse Rosa 26R arborant le gène LacZ, des expériences de caractérisation de la lignée ITGA11-Cre ont été menées dans un modèle de fibrose cardiaque sur des tissus adultes. Lors de fibrose cardiaque, nous relatons ici que β -galactosidase est principalement exprimée en périphérie des régions fibreuses. Il a aussi été montré que l'intégrine $\alpha 11$ est surexprimée lors de fibrose cardiaque. La caractérisation de cette lignée murine ITGA11-Cre semble prometteuse, d'autres expérimentations doivent continuer à être mener afin de confirmer ces résultats.

BERGEN • Norvège

03/06/2019 → 27/09/2019



Characterisation of the ITGA11-Cre mouse strain.

Fibroblasts have been shown to play an important role in tissue fibrosis and stroma cancer. Interest in further understanding the mechanisms involved in those pathological conditions has been growing. The fibroblasts-specific integrin $\alpha 11\beta 1$ is similarly receiving growing attention regarding wound healing and fibrosis, conditions in which integrin $\alpha 11\beta 1$ might be used as a relevant biomarker for fibroblasts. To gauge the importance of fibroblasts, a transgenic ITGA11-Cre mouse strain, with Cre recombinase expression restricted to fibroblasts, has been generated for cell lineage tracing and integrin $\alpha 11$ -specific gene deletion. After breeding this transgenic mouse line with Rosa 26R reporter mice harbouring LacZ gene, characterisation of the ITGA11-Cre mouse strain was studied in cardiac fibrosis in adult mouse tissues. We now report that β -galactosidase expression is mainly restricted to the periphery of fibrotic regions in hearts. Integrin $\alpha 11$ has been also shown to be upregulated in cardiac fibrosis. The characterisation of the ITGA11-Cre mouse strain looks promising, further experiments should be conducted to confirm those results.



Justine LAULIN

L'épilepsie est une affection neurologique touchant 50 millions de personnes dans le monde et dont 30% des formes sont encore résistantes aux traitements existants. Comprendre les mécanismes de formation de ce trouble est nécessaire afin de mettre au point de nouveaux traitements plus efficaces.

Les maladies du complexe SNARE sont des maladies neuropsychiatriques causées par une mutation affectant les protéines du complexe. Celles-ci sont un groupe de protéines hautement conservées impliquées dans la transmission synaptique. Il a été démontré que des mutations dans 3 gènes spécifiques codant pour les protéines STX1B, STXBP1 et PRRT2 sont à l'origine de phénotypes épileptiques dont la plupart sont pharmaco-résistants.

L'utilisation du poisson zèbre (*Danio rerio*) pour modéliser des troubles humains est devenu de plus en plus courant au cours des dernières années, ce modèle présentant divers avantages par rapport aux rongeurs. Les poissons zèbres disposent d'embryons transparents qui permettent une visualisation directe du processus de développement, et ils se reproduisent rapidement et en grande quantité ce qui permet la mise en place de screening de drogues à grande échelle.

L'objectif de ce projet est de caractériser trois lignées mutantes de poissons zèbre (mutées au niveau des trois gènes cités ci-dessus) qui pourraient être utilisées pour modéliser les épilepsies liées au complexe SNARE. Les trois gènes étudiés sont présents chez le poisson zèbre (*stx1b*, *stx1a* et *prrt2*) avec une forte homologie vis-à-vis de leur orthologue humain. Nous avons dans un premier temps essayé de déterminer si une relation entre le génotype des mutants et leur phénotype était visible, afin de les identifier facilement. Nous avons ensuite étudié si les mutants étaient sujets à des crises épileptiques en réalisant des EEG et en étudiant leur activité locomotrice. Nous avons également essayé de rétablir le phénotype sauvage en injectant le gène STX1B humain aux mutants correspondants.



Epilepsy is a disabling disease affecting more than 50 million of people worldwide and 30% of the diverse forms of epilepsy are resistant to available drugs. Understanding the genesis and mechanisms of this disorder is a necessity in order to develop new effective treatments.

SNARE-opathies are neuropsychiatric disorders caused by a mutation in proteins of the SNARE complex, which are a group of highly conserved proteins implied in neurotransmitter release. Mutations in three particular genes coding for the STXBP1, STX1B and PRRT2 proteins have been found to cause seizure phenotypes that are mostly resistant to drugs.

Using zebrafish (*Danio rerio*) to model human disorders has become more and more common in the recent years, as zebrafish display several advantages over rodents. They have transparent embryos, allowing direct visualization of the developmental process and produce large progenies, which enables to perform large-scale pharmacological screens.

The aim of this project is to characterize three lines of zebrafish mutants (mutated in the 3 genes cited above) that could be used to model SNARE-opathies. The three genes studied are present in the zebrafish genome (*stx1b*, *stx1a* and *prrt2*) with a strong homology to their human orthologue. We first tried to establish whether there was a relation between phenotype and genotype, to determine if the mutants are easily identifiable. We then assessed the mutant's ability to show seizures, by performing EEG and locomotor tracking, as this is a key-feature of SNARE-opathies. A rescue experiment with the human STX1B gene was also carried out



Chloé MARIANT

Définir l'impact des cellules gliales entériques sur les fonctions des cellules souches adultes intestinales in vitro et in vivo.

L'épithélium intestinal est un des tissus de l'organisme se renouvelant le plus rapidement (3-7 jours selon espèce et partie de l'intestin). Ce fort taux de renouvellement est assuré par des cellules souches épithéliales intestinales multipotentes adultes qui ont fait l'objet d'intenses recherches depuis une dizaine d'années grâce à l'identification de marqueurs spécifiques et le développement de modèles murins transgéniques rapporteurs. Le modèle de souris Sox9-EGFP a l'avantage unique de permettre la visualisation, la quantification et l'isolation des CSI mais également d'autres types de cellules épithéliales. En effet, dans ce modèle, les CSI expriment modérément l'EGFP, tandis que des niveaux élevés ou faibles de l'EGFP marquent respectivement les cellules entéroendocrines et les progéniteurs. Les cellules n'exprimant pas l'EGFP correspondent aux autres cellules différenciées épithéliales intestinales (entérocytes, cellules mucosécrétantes et cellules de Paneth). Les fonctions des cellules souches sont régulées par des mécanismes moléculaires intrinsèques ainsi que des signaux extrinsèques provenant de cellules appartenant au microenvironnement ou niche des CSI, dont font partie les cellules gliales entériques (CGE). De nombreuses études ont désormais établi que les CGE contrôlent les fonctions de la barrière épithéliale intestinale, mais leur impact sur les CSI n'a pas encore été étudié. Le but de ce projet était de tester si les CGE régulent les CSI in vivo et in vitro. Pour ce faire nous avons utilisé le modèle Sox9-EGFP ainsi que le modèle murin transgénique GFAP-hM3Dq dans lequel un traitement au Clozapine N-Oxide (CNO) active spécifiquement les cellules gliales exprimant la GFAP. En utilisant des souris double transgéniques Sox9-EGFP/GFAP-hM3Dq traitées ou non pendant 7 jours, nous avons tout d'abord défini l'impact de l'activation des EGC sur les proportions des différentes populations Sox9-EGFP par cytométrie en flux et sur la capacité intrinsèque des CSI à générer des enteroïdes dans un système de culture 3D. Dans un deuxième temps, nous avons testé l'impact de cultures primaires de CGE isolées de souris GFAP-hM3Dq, puis activées ou non in vitro avec du CNO, sur la capacité des CSI à générer des enteroïdes dans des systèmes de co-culture 3D n'autorisant que des échanges paracrines entre les CSI et les CGE ou en utilisant les milieux conditionnés des CGE. Nos données de cytométrie de flux suggèrent que le traitement au CNO in vivo n'entraîne pas de changement de pourcentage de CSI ou de cellules entéroendocrines par rapport aux souris contrôles mais entraîne une augmentation de la proportion des progéniteurs. Nos données préliminaires tendent à suggérer une augmentation de la capacité à initier la formation d'enteroïdes dans les CSI isolées des souris traitées au CNO par rapport aux contrôles. Nos résultats suggèrent que in vitro la présence et le milieu conditionné de CGE contrôles ou non stimulées entraîne une augmentation du nombre d'enteroïdes issus des CSI, suggérant qu'en basal, les CGE libèrent un ou des facteur(s) soluble(s) qui stimule(nt) les CSI. En revanche, l'activation in vitro des CGE GFAP-hM3Dq au CNO semble entraîner une augmentation de la taille mais pas du nombre des enteroïdes. Ainsi nos données montrent que l'activation des CGE stimule la capacité des CSI à initier la formation des enteroïdes in vivo mais pas in vitro. Ces résultats montrent également que l'activation in vitro et in vivo des CGE stimule la production de nouvelles cellules épithéliales comme le démontre l'augmentation du pool de progéniteurs et de la taille des enteroïdes formés. L'identification du ou des facteur(s) soluble(s) et des voies de signalisations impliquées pourrait permettre à terme le développement de nouvelles stratégies de thérapies pour stimuler la régénération de l'épithélium intestinal.



Define enteric glia cell impact on adult intestinal stem cell functions in vitro and in vivo.

Intestinal epithelium is one of the fastest renewing tissue of the body (3-7 days depending on species and regions). This high renewal rate is driven by adult multipotent intestinal epithelial stem cells which have been the subject of intense investigations over the last decade since the identification of specific markers and the development of reporter transgenic mice. The Sox9-EGFP murine model has the unique advantage of allowing for the visualization, quantification and isolation of intestinal stem cells (ISC) as well as other intestinal epithelial cell types. In this model, ISC express moderate levels of EGFP, while high or low levels of EGFP are found respectively in enteroendocrine cells and progenitors. Cells that do not express EGFP correspond to all other differentiated intestinal epithelial cells including enterocytes, goblet and Paneth cells. ISC functions are regulated by intrinsic molecular mechanisms as well as extrinsic signals emanating from cells of their microenvironment or niche, which notably comprises enteric glial cells (EGC). Several studies have established that EGC are master regulators of intestinal epithelial barrier functions, but their impact on ISC has not been studied yet. This project aimed to test whether EGC regulate ISC in vivo and in vitro. To do this, we used the Sox9-EGFP mouse model as well as the transgenic mouse model GFAP-hM3Dq that allows for the conditional activation of EGC upon a Clozapine-N-Oxide (CNO) treatment. Using double transgenic mice Sox9-EGFP/GFAP-hM3Dq treated or not with CNO for 7 consecutive days, we first defined the impact of EGC activation on the proportions of the different Sox9-EGFP cell populations by flow cytometry and on intrinsic ISC enteroid-forming ability in 3D culture. Then, we tested the impact of CNO- or vehicle-treated EGC primary cultures isolated from GFAP-hM3Dq mice on ISC enteroid-forming abilities in a 3D co-culture system allowing only paracrine communication between EGC and ISC, or using EGC conditioned medium. Our flow cytometry data suggest that in vivo CNO treatment does not induce an increase in the proportion of ISC or enteroendocrine cells as compared to the control mice; but leads to an increase in the proportion of progenitors. Our preliminary data suggest a trend towards an increase in enteroid-forming abilities in ISC isolated from CNO-treated mice vs. controls. Our results suggest that in vitro EGC and EGC conditioned medium induce an increase in enteroid numbers yielded from ISC, suggesting that at basal state, EGC release one or several soluble factors stimulating ISC. However CNO-induced activation of GFAP-hM3Dq EGC seems to increase enteroid size, but not number. Altogether our data show that EGC activation stimulates ISC enteroid-forming abilities in vivo but not in vitro. Our results also suggest that in vivo and in vitro EGC activation stimulate the generation of epithelial mass, as shown by increased progenitor proportion and increased enteroid size. Identification of the soluble factor(s) and signaling pathways involved might lead to the development of new therapy strategies aiming to stimulate intestinal epithelium regeneration.



Paul MARTEAU

Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale (PTIB)

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Florence OTTONES**

Projet de fonctionnalisation de nano-objets avec des anticorps humains pour l'imagerie de ciblage de la plaque d'athérome.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par l'accumulation de lipides dans la paroi des artères sous forme de plaques. La rupture de ces plaques entraîne la formation d'un caillot (thrombus) qui bloque la circulation sanguine et provoque une ischémie dont les conséquences peuvent être graves ou mortelles : elle concerne une artère coronaire dans l'infarctus du myocarde (IDM), ou une artère carotide en cas d'accident vasculaire cérébral (AVC).

Le travail de l'équipe se concentre sur un type cellulaire du système immunitaire, les macrophages, qui à l'intérieur de la plaque d'athérome présentent un comportement pathologique et sont responsables de son instabilité.

Mon travail intervient à deux niveaux :

Premièrement, le développement d'un modèle in vitro de ce type pathologique de macrophage et l'étude de son métabolisme à travers différentes techniques (multi-marquage, sea-horse).

Deuxièmement, la sélection d'anticorps humains spécifiques de ces macrophages, issus d'un premier pool d'anticorps sélectionner par phage-display sur un lapin athéromateux.

Le développement d'un anticorps spécifique permettrait le transport de molécules diagnostiques ou thérapeutiques jusqu'à la plaque.

PESSAC • France

13/05/2019 → 27/09/2019



Project of functionalization of nanoobjects with human antibodies targeting atheroma plaque.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by the accumulation of lipids in the wall of arteries in the form of plaques. The rupture of these plaques lead the formation of a clot (thrombus) which blocks the blood circulation and causes ischemia whose consequences can be serious or fatal: it concerns a coronary artery in the myocardial infarction (MI), or a carotid artery in case of stroke.

The team's work focuses on a cellular type of the immune system, the macrophages, which within the atheroma plaque exhibit pathological behavior and are responsible for its instability.

My work is at two levels:

First, the development of an in vitro model of this pathological type of macrophage and the study of its metabolism through different techniques (multi-tagging, sea-horse).

Second, the selection of human antibodies specific for these macrophages, derived from a first pool of antibodies selected by phage display on an atheromatous rabbit.

The development of a specific antibody would allow the transport of diagnostic or therapeutic molecules to the plaque.



Marta MARTIN CORREDERA

THE OPEN UNIVERSITY

Tuteur(s) / Supervisor(s): **David MALE**

Développement de nanoparticules d'or avec un peptide de ciblage pour délivrer des agents thérapeutiques au Système Nerveux Central.

La barrière hématoencéphalique (BBB) est une des causes de l'impossibilité de traiter la plupart des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson. . .) qui touchent plus de 30 millions de personnes au monde. L'étanchéité des jonctions serrées présentes entre les cellules endothéliales des microvaisseaux du cerveau, les transporteurs qui pompent les substances endogènes et exogènes nocives hors de la cellule et également de faibles ratios de transcytose sont, combinés, les éléments qui protègent le Système Nerveux Central (SNC). Cependant, ils empêchent le transport de la plupart des agents thérapeutiques. Par conséquent, l'intérêt de cibler spécifiquement le SNC pour transporter des médicaments au travers de cette barrière physiologique est majeur.

Une alternative pour atteindre le SNC est l'utilisation de nanoparticules d'or (NPs) en tant que transporteurs. Il s'agit de fixer avec des liaisons covalentes des peptides ligand-spécifiques aux NPs d'or. Ces peptides ont été choisis pour aider à la traversée de la barrière hématoencéphalique en ciblant des récepteurs constitutifs (i.e. le récepteur à la transferrine (TfR) ou le récepteur au LDL) dans un but thérapeutique. Plusieurs peptides ont la capacité d'interagir spécifiquement avec le récepteur à la transferrine (TfR) qui est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales cérébrales. Ainsi, ces cellules pourront internaliser les transporteurs d'or couplés aux peptides de ciblage par endocytose après s'être lié au TfR.

L'objet de ce projet était dans un premier temps de déterminer la stœchiométrie et les caractéristiques des peptides candidats attachés aux NPs. Ces analyses ont été effectuées par électrophorèse sur gel d'agarose pour analyser les paramètres de la réaction, et par chromatographie en phase liquide (FPLC) en utilisant les techniques de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et chromatographie échangeuse d'ions (IEC) pour caractériser et purifier les peptide-NPs. Deuxièmement, les conditions physico-chimiques de la réaction conçue pour attacher les peptides aux NPs ont été testées et optimisées.

A posteriori, le produit de la réaction a été purifié par FPLC, et les NPs enrobées de peptide ont été incubées in vitro avec une lignée cellules endothéliales cérébrales humaines (hCMEC/D3). Finalement, l'absorption des peptides attachés aux NPs a été quantifiée par microscopie électronique de transmission (TEM) afin de déterminer le peptide qui, attaché aux NPs, permet une traversée plus efficace à travers la barrière hématoencéphalique.

MILTON KEYNES • Royaume-Uni

10/06/2019 → 20/09/2019



Developing gold nanoparticles with targeting peptides for delivery of therapeutic agents to the Central Nervous System.

Nowadays more than 30 million people worldwide are suffering from neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's disease. The blood-brain barrier (BBB) is one of the causes of the inability to treat most of these diseases by preventing the transport into the brain of most therapeutic agents. This transport is mainly restricted by tight junctions located in-between endothelial cells of brain microvessels, multidrug transporters that pump the harmful endogenous and exogenous substances out of the cell and also low ratios of vesicular transcytosis. All of them combined in order to protect the central nervous system (CNS). Therefore, there is an increasing interest on specifically targeting the brain to transport drugs across this physiological barrier. An alternative to deliver therapeutic agents within the CNS is the use of 2nm-gold nanoparticles (NPs) as carriers. The strategy consists in attaching covalently ligand-specific peptides to the gold NPs. These attached peptides can help cross the BBB by targeting constitutive receptors (i.e. Transferrin receptor (TfR) or LDL-receptor) for a therapeutic purpose. Several peptides have the ability to bind specifically to the TfR which is highly expressed on the surface of brain endothelial cells (BEC). Thus, these cells could take up gold nanocarriers with TfR-targeting peptides by endocytosis following binding to the TfR.

The purpose of this project was initially to determine the stoichiometry and characteristics of peptide candidates attached to the NPs. These analytic methods were performed by agarose gel electrophoresis to analyse the reaction conditions, and by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) with Size Exclusion Chromatography (SEC) or Ion Exchange Chromatography (IEC) to characterize and purify the peptide-NPs. Furthermore, physicochemical conditions of the ligand-exchange reaction used to attach the peptides to the NPs were tested and optimized. Afterwards, the reaction products were purified by FPLC, and peptide-attached NPs were incubated with a human brain endothelial cell line (hCMEC/D3). Finally, cellular uptake was quantified by transmission electron microscopy (TEM) in order to determine whether the peptide attached to the NPs promotes a more efficient crossing through the BBB.



Romane MAUDUIT

Caractérisation d'un complexe moléculaire du centriole formé de protéines impliquées dans la dégénération rétinienne.

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage s'intéresse à l'étude de la structure du centriole. Deux centrioles composent le centrosome, qui est responsable de la formation du fuseau mitotique microtubulaire lors de la division cellulaire ainsi que de la formation de cils primaires ou motiles. Le centriole est un cylindre composé de neuf triplets de microtubules associées les uns aux autres de manière circulaire. Le laboratoire s'intéresse particulièrement à l'organisation et à la composition des structures permettant cette organisation circulaire. Il a mis en évidence la présence d'une structure tapissant l'intérieur des triplets de microtubules recouvrant plus de 70 % du centriole et composée de quatre protéines formant un complexe avec les microtubules. Ces 4 protéines sont toutes impliquées dans des cas de dégénérescence rétinienne, pathologies associées à une désorganisation des cils connecteurs des cellules photoréceptrices de la rétine. Bien que ces 4 protéines aient été impliquées dans la fonction du centriole, leur rôle dans sa stabilité et sa structure reste à démontrer.

Dans le cadre de mon stage, je me suis attachée à répondre à cette question en utilisant différentes approches. J'ai étudié l'impact et la localisation de la surexpression de ces protéines dans des cellules humaines d'ostéosarcome (U2OS) par immunofluorescence. La surexpression de ces 4 protéines entraîne la formation de faisceaux de fibres associées aux microtubules les rendant résistants à la dépolymérisation provoquée par le froid. Cette caractéristique, réservée à certains microtubules, notamment ceux composant le centriole, m'a poussée à étudier la structure fine de ces faisceaux en utilisant deux techniques complémentaires : la microscopie à expansion et la cryo-microscopie électronique. J'ai ainsi pu analyser différentes caractéristiques de ces fibres telles que leurs diamètres ainsi que l'organisation des protéines qui les compose, afin de comprendre si leur organisation était similaire à celle que nous pouvions trouver au sein du centriole lui-même.



Characterization of a centriolar protein complex associated with human retinal degeneration.

The laboratory where I did my internship studies the centriole structure. Centrioles compose the centrosome, which drives the mitotic spindle during cell division, as well as template the formation of cilium. The centriole is a cylinder made of nine microtubule triplets attached together in a circular manner. The laboratory is particularly interested in what maintains microtubule triplets together and ensures overall centriole cohesion. They demonstrated that 70 % of the inner part of the centriole is covered by an extended helical structure composed in part by a four-protein-complex interacting with microtubules. Interestingly, these four proteins have been associated with retinopathies, diseases associated with a disorganization of the connecting cilium from retinal photoreceptors cells. While numerous evidences show the involvement of these proteins in the centriole function, their role in centriole stability and structure remain to be elucidated.

During my internship, I used different approaches to tackle this question. I studied the effect and the localization of these proteins when overexpressed in human osteosarcoma cells (U2OS) by immunofluorescence. Interestingly, the overexpression of these 4 proteins result in the formation of fibers containing microtubules, which were cold-shock resistant. This feature, restricted to specific microtubules, including centriolar microtubules, pushed me to study the ultrastructure of these bundles using two complementary approaches: expansion microscopy and cryo-electron microscopy. I could then analyze different features of the fibers such as their diameter and their proteic organization, in order to understand if their organization reflects the organization seen at centrioles.



Morgane MELLARE

Etude de l'effet des composés lixiviables et extractifs (L&E) sur le métabolisme des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary).

Le principal objectif de ce stage réalisé au sein de l'école de Biochimie et d'Immunologie du Trinity College a été d'étudier l'effet des composés L&E sur le métabolisme des cellules CHO. Les cellules mammifères CHO (Chinese Hamster Ovary) sont les cellules les plus utilisées dans l'industrie pour la production de protéines thérapeutiques car elles permettent d'obtenir un repliement et des modifications post-traductionnelles adéquats pour l'activité biologique de la protéine. Les réacteurs poche à usage unique sont de plus en plus utilisés pour la culture cellulaire car ils permettent un gain de temps sans étape de nettoyage et de stérilisation, une certaine flexibilité et une baisse des contaminations croisées. Cependant, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'effet que pourraient avoir les composés lixiviables et extractibles libérés par ces poches en plastique lors de la culture cellulaire sur la qualité de la protéine produite et donc la santé des patients. Un de ces composés : le bis(2,4-di-tert-butylphényl) phosphate (bDtBPP), retrouvé en forte concentration dans le milieu cellulaire, aurait un effet nocif sur la croissance des cellules. L'objectif de ce projet est de comprendre comment le bDtBPP agit sur le métabolisme des cellules et comment cela entraîne une inhibition de la croissance des cellules. Les principales voies métaboliques dans les cellules de mammifères sont la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphate, la phosphorylation oxydative et le métabolisme des acides aminés. Certaines de ces voies métaboliques ont été identifiées comme étant affectées par le bDtBPP. Ces chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une enzyme spécifique d'une de ces voies métaboliques pourrait être inhibé par ce composé. Ma participation à ce projet a donc pour objectif de mettre en place un essai enzymatique avec cette enzyme commerciale et avec des lysats cellulaires issus de deux lignées (CHO DP-12, CHO-S). Une fois cet essai mis en place, l'objectif est de tester l'inhibiteur bDtBPP afin de comprendre si celui-ci inhibe l'activité de l'enzyme. Cette expérience permettra d'apporter des connaissances supplémentaires sur les mécanismes liés à l'inhibition de la croissance cellulaire dans ces réacteurs à usage unique.



Metabolic flux in biotherapeutic-producing CHO and how it is controlled by mitochondrial dynamics.

The main task of this internship realized in the School of Biochemistry and Immunology was to study the effect of leachables and extractables from single-use bioprocessing systems on the metabolism of biotherapeutic-producing CHO cells. CHO (Chinese Hamster Ovary) cells are the most commonly used in the industry to produce recombinant biopharmaceuticals; these cells have the capacity for proper protein folding, assembly and post-translational modification. Nowadays, more and more laboratories are using single use technology for cell culture instead of fixed stainless-steel fluid-handling units as this provide: an important time gain because no steps of sterilization are required, flexibility, and a decrease of cross-contamination. Significant concerns about the potential effect of extractables and leachables arising from the components of single-use systems owing to their potential effect on product quality and patient health are raised. One of the leachables; the cytotoxic compound bis(2,4-di-tert-butylphényl) phosphate (bDtBPP) is leached into cell culture media in concentrations that are deleterious to cell growth. The aim of the study in which I participate in is to understand the underlying mechanism of the negative influence of bDtBPP on cell growth. The key metabolic pathways in cultured mammalian cells are glycolysis, TCA cycle, the pentose phosphate pathway, oxidative phosphorylation and amino acid metabolism. Some parts of these metabolic pathways were identified to be affected by bDtBPP. In these pathways, one specific enzyme is suspected to be inhibited by this compound. Finally, my part in this project was to realize an enzymatic assay of this specific enzyme with a pure enzyme (from E.Coli) and cell lysates of two CHO cell lines (CHO-DP12, CHO-S). Once this assay is set, the main objective is to test the inhibitor bDtBPP on this enzyme and see if its activity is affected. This experience will provide some more information about which mechanism is responsible for the deterioration of CHO cell growth in disposable plastic bags.



Loanne MILVOY

University of Westminster, Faculty of Science and Technology

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Ian HARMER

Conversion de scFv humains dérivés de patients atteints de lymphome folliculaire en IgG entiers pouvant être exprimés par des bactéries.

Lors de mon stage à l'Université de Westminster, j'ai eu l'occasion de prendre part à une étude sur le lymphome folliculaire (LF). Ce type de cancer induit la modification des lymphocytes B et leur multiplication incontrôlée. La pathogénèse de cette maladie est encore mal connue : l'apparition du cancer est souvent liée à la translocation t(14;18) mais il existe des individus sains ayant cette translocation donc ce n'est pas la seule cause de la maladie. Certaines recherches ont montré que la reconnaissance d'antigènes par les BCR des lymphocytes cancéreux induirait un signal de croissance de ces cellules (Küpper R, 2005 Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis). Connaître ces antigènes permettrait de mieux comprendre ce type de cancer et de trouver des traitements, par exemple en visant la source de ces antigènes ou bien leur interaction avec les BCR.

L'objectif du projet est donc d'identifier ces antigènes en étudiant l'affinité des BCR issus de différents patients avec des molécules susceptibles d'être des antigènes. Pour mettre à bien ce projet, la première étape est d'obtenir les immunoglobulines G (IgG) de différents patients atteints de LF. Le moyen le moins coûteux de les produire en grande quantité est de passer par l'expression bactérienne.

Des plasmides codant pour les scFv (single chain variable fragments) issus de différents patients étaient à disposition. Ces plasmides contiennent les parties variables des chaînes lourdes et légères d'anticorps exprimés par les lymphocytes malins. Ma mission a été de récupérer ces gènes pour les insérer dans des vecteurs comportant les parties constantes d'une IgG par la méthode de clonage moléculaire traditionnel afin de pouvoir transformer des bactéries avec ce vecteur pour produire et recueillir les IgG.

LONDON • Royaume-Uni

17/06/2019 → 15/11/2019

UNIVERSITY OF WESTMINSTER



The conversion of human scFv derived from patients with follicular lymphoma into whole IgG that can be expressed in bacteria.

During my internship at the University of Westminster, I had the opportunity to participate in a study on follicular lymphoma (FL). This type of cancer causes the modification of B lymphocytes and their uncontrolled multiplication. The pathogenesis of this disease is still not well known. The appearance of this cancer is often related to t(14;18) translocation but there are healthy individuals with this translocation so it is not the only cause of the disease. Some research has shown that the recognition of antigens by the BCRs of cancerous lymphocytes would induce a growth signal of these cells (Küpper R, 2005 Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis). It would be interesting to know these antigens because it would enable a better understanding of this type of cancer and could lead to the discovery of treatments. For example, these treatments could target the source of these antigens or their interaction with BCRs.

The objective of the project is to identify these antigens by studying the affinity of these BCRs from different patients with molecules likely to be antigens. To complete this project, the first step is to obtain immunoglobulins G (IgG) from different patients with FL. The cheapest way to produce them in large quantities is to use bacterial expression.

Plasmids coding for scFv (single chain variable fragment) from different patients were available. These plasmids contained the variable parts of the heavy and light chains of antibodies produced by malignant lymphocytes. My mission was to insert these genes into vectors by the traditional molecular cloning method in order to be able to transform bacteria with this vector to produce and collect the IgGs.



Emeline PARTY

NOFIMA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Ragnhild WHITAKER

Etude de l'impact de traitements préalables de la peau de morue sur le rendement d'hydrolyse et le goût du produit obtenu.

Nofima AS est un institut de recherche dans le domaine de l'aquaculture et de l'agroalimentaire. Leur travail consiste à développer des techniques permettant d'améliorer la qualité des produits pour les consommateurs en s'appuyant sur leurs besoins, de valoriser les déchets de l'aquaculture ou encore d'améliorer la santé des saumons produits en élevage. J'ai réalisé mon stage au sein du groupe Marine Biotechnology dont les projets reposent essentiellement sur l'exploitation des déchets provenant d'espèces marines (saumon, poissons blancs ou crustacés) pour produire divers produits ou ingrédients. De nombreux composants des poissons ou crustacés tels que la peau, la tête ou la coquille ne sont pas consommables par l'homme et constituent une importante source de déchets. Le projet portait sur l'étude de l'effet de différents prétraitements de la peau de morue sur le rendement d'hydrolyse et le goût du produit obtenu. Deux prétraitements ont été étudiés : une étape de lavage et/ou de broyage. Une première expérience a été réalisée avec des peaux de morues qui ont été soit non traitées soit lavées avant hydrolyse. L'enzyme pouvant aussi avoir un impact sur le rendement et le goût, deux enzymes différentes ont été testées lors de l'hydrolyse. Une deuxième expérience a été réalisée en utilisant des matières premières non traitées, lavées ou broyées mais aussi avec des peaux qui ont été lavées et broyées. Cette expérimentation a été effectuée avec trois enzymes différentes. Une fois les résultats liés au rendement et au test gustatif obtenus, le meilleur échantillon a été sélectionné pour réaliser un scale-up du procédé à l'échelle pilote.

Tromsø • Norvège

17/06/2019 → 13/08/2019

Nofima



Study on the effects of previous treatments of cod skins on hydrolysis yield and product taste.

Nofima AS is a research institute in the field of fisheries, aquaculture and food research. They work on the development of techniques to increase products quality for consumers depending on their needs, to optimize the value creation of aquaculture by-products and to improve farmed fish health.

I undertake my work placement in the Marine Biotechnology department. Research projects in this department aim at using marine rest raw materials from different species (salmon, whitefish or shellfish) to produce valuable products or ingredients. Numerous components of fish or shellfish as skin, head or backbone are not used for human consumption and represent a significant source of waste. The project was about the effects of previous treatments of cod skins on hydrolysis yield, protein recovery and taste of the final product. Two pre-treatments were studied: a washing step and/or a grinding step. A first experiment was done with cod skins which were either left un-treated or washed before hydrolysis. The enzyme may also have an impact on yield and taste that is why two different enzymes were tested. A second experiment was conducted with non-treated, washed and grinded raw material but also with washed and grinded skins. Three different enzymes were tested using these parameters. Once results concerning hydrolysis yield and taste obtained, the best sample was chosen to do a scale-up of the process in pilot scale.



Laura PELTIER

ID.VET

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Magali CONTIN**

Développement d'une technique d'immuno-détection.

IDvet est une entreprise spécialisée dans le développement et la production de kit de diagnostic vétérinaires pour des maladies infectieuses. La maladie concernant ce projet est la mammites bovine qui est une inflammation de la glande mammaire souvent d'origine bactérienne. Cette maladie a des conséquences sur l'industrie laitière car elle peut altérer la production de lait ainsi que créer des dommages irréversibles sur la glande mammaire. Les mammites peuvent être asymptomatiques, ce qui ne facilite pas la détection de la maladie. Actuellement lorsqu'il y a suspicion d'une mammites, un étalement de lait est réalisé sur gélose non sélective. Cette méthode prend du temps, c'est pourquoi le projet a pour but de développer une méthode de dosage qualitatif de marqueurs de l'infection pour permettre un diagnostic. Ces marqueurs d'infections sont les Immunoglobulines A sécrétées dans le lait, une technique d'immuno-capture d'IgA à partir d'anticorps anti IgA sur plaque est développée. Après une infection, la quantité d'IgA retrouvée dans le lait est supérieure à la quantité normale, ce qui va permettre de distinguer les positifs des négatifs. Cette méthode est ensuite déclinée en ELISA indirect pour détecter des IgA spécifique d'un pathogène souvent responsable des mammites : le Staphylococcus aureus. Pour cela des bactéries inactivées sont sensibilisées en fond de plaque, cependant pour déterminer précisément si un individu est sain ou atteint d'une mammites provoquée par staphylococcus aureus d'autres expériences seront nécessaires. L'intérêt du projet est double, en effet, pour l'instant l'objectif était d'utiliser les IgA comme marqueurs, tandis qu'il est également possible d'utiliser les IgA comme outil d'immuno-concentration afin d'identifier par biologie moléculaire les pathogènes présent dans un échantillon de lait. Dans la dernière partie de ce rapport, l'enjeu est de sensibiliser des billes magnétiques avec des anti-IgA afin de concentrer les IgA et les pathogènes fixés à leur surface et peut être un jour les identifier par biologie moléculaire. La méthode d'ELISA de type capture développée dans la première partie a été transposée sur des billes magnétiques. Les paramètres déjà définis ont été optimisés et des nouveaux ont été explorés. La méthode de sensibilisation sur billes magnétiques fonctionne pour diagnostiquer les mammites, ce qui signifie que la fixation d'IgA est efficace et pourrait permettre d'étudier les pathogènes des échantillons.

GRABELS • France

03/06/2019 → 30/08/2019

IDvet



Development of an immunodetection technique.

IDvet is a company specialised in the development and the manufacture of veterinary diagnostic tests of infectious diseases. This project deals with the bovine mastitis, which is an inflammatory reaction of the udder tissue often due to microorganisms infections. Consequences of this disease on the dairy industry are huge, in fact, it can deteriorate milk production and damage the mammary gland infected irreversibly. Diagnosis of mastitis is not an easier task because it can be asymptomatic. Currently, when a mastitis is suspected, a plating is done on a non selective agar. This is a time-consuming approach, this is why the project aims to develop a new approach of qualitative analysis of infection markers to diagnose mastitis. These infection markers are immunoglobulins A secreted in milk, an IgA immunocapture assay based on anti IgA antibodies is developed in a 96 microwell plate. After an infection, the amount of IgA in milk is higher than the normal amount, that difference will enable the distinction between positive and negative samples. This assay is, in a second part, transformed into an indirect ELISA to detect staphylococcus aureus specific IgA, because it's a common pathogen which usually leads to mastitis. To do that, inactivated bacteria are coat in a 96 microwell plate. However, other experiences are needed to determine if a subject is healthy or affected by mastitis. The aim of the project is double, in fact, for now, the goal was to use IgA as markers while it is also possible to use them as immunocentration tools to identify the pathogens in the milk sample using molecular biology. In the last part of this report, the issue is to coat anti IgA on magnetic beads to concentrate the IgA and the pathogens fixed on them, for maybe one day identify these pathogens by molecular biology. In order to achieve this, the IgA immunocapture assay developed in the first part has been transposed on magnetic beads instead of microwell plate. Pre-defined parameters have been optimise and new ones have been investigated. The approach of coating anti IgA on magnetic beads work to diagnose mastitis, which means that IgA binding is effective and could enable to identify pathogen sample.



Léa PIGUET

TALBOT LAB

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Sébastien TALBOT**

Étude de l'expression des récepteurs de neuropeptides chez les lymphocytes T CD8+ en co-culture avec des neurones sensoriels.

L'organisme possède un mécanisme de défense complexe afin d'agir rapidement et efficacement contre les agressions extérieures. Ce mécanisme est basé sur l'intervention de deux systèmes hautement complémentaires : le système nerveux et le système immunitaire. Ces deux organisations sont étroitement liées afin de permettre l'élimination des agents pathogènes sans compromettre l'intégrité des cellules saines. L'équipe de recherche du Dr TALBOT étudie l'interaction entre ces deux systèmes qui est permise par la sécrétion de nombreuses molécules comme les cytokines, les neuropeptides ou les facteurs de croissance. Un dysfonctionnement de cette interaction peut conduire à une boucle inflammatoire et de nombreuses pathologies comme l'asthme et les allergies. Il est possible de concevoir que ce système contribuerait l'immunité antitumorale. Des études récentes ont d'ailleurs montré que la taille de la tumeur diminue lorsque l'on inhibe localement les neurones sensoriels et, puisque l'activité anti-tumorale est contrôlée par les lymphocytes T cytotoxiques, on peut se demander quelle peut être leur interaction avec les neurones. En effet, les lymphocytes T CD8+ expriment des facteurs de co-inhibition à leurs surfaces (appelés points de contrôles immunitaires) qui, une fois en interaction avec leur ligand, conduisent à l'inhibition des fonctions des lymphocytes permettant ainsi un retour à la normale et une restauration de l'homéostasie après une inflammation. En exprimant ces ligands ou en régulant leur production, les neurones sensoriels peuvent ainsi contrôler la régulation de la réponse immunitaire. Mon projet a consisté à : 1) Chercher si les lymphocytes T CD8+ exprimaient à leur surface des récepteurs des neuropeptides ; 2) Regarder si cette expression varie en co-culture avec des neurones ; 3) Comparer l'expression des points de contrôle immunitaires entre des lymphocytes T CD8+ en culture seule ou avec des neurones. Les chercheurs du laboratoire s'intéressent au fait que les cellules cancéreuses détournent cette capacité des neurones sensoriels afin d'inhiber localement les lymphocytes T, empêchant ainsi ceux-ci de détruire la tumeur. En comprenant quels neuropeptides sont responsables de l'inhibition des cellules immunitaires, il est possible d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre certains cancers. Afin de comprendre ces mécanismes, de nombreuses techniques sont utilisées au laboratoire du Dr. TALBOT : culture de neurones, lymphocytes, microscopie à fluorescence, imagerie calcique, qPCR et cytométrie en flux.

MONTREAL • Canada

03/06/2019 → 13/09/2019



CD8+ T cells express neuropeptide receptors when co-cultured with sensory neurons.

The body evolve complex defense mechanism against external dangers. These mechanisms involved two highly complementary systems: the nervous and the immune systems. These organizations are closely linked to enable the elimination of pathogens without compromising the integrity of healthy cells. Dr. TALBOT's research team is studying the interaction between these two systems which are enabled by the secretion of cytokines, neuropeptides and growth factors. A dysfunction of this interaction can lead to an inflammatory loop observed pathologies such as allergies. Recent studies showed that tumor size decreases when local sensory neurons are inhibited and, since antitumor immunity is controlled by cytotoxic T lymphocytes, we wonder what the nature of their interaction with neurons. CD8+ T cells express co-inhibitory factors, known as immune checkpoints, which, once activated by their cognate ligand lead to their exhaustion. By expressing these ligands or regulating their production, sensory neurons can control antitumor immunity. Thus, my colleagues at the lab hypothesized that cancer cells divert neuro-immune interplay in the tumor microenvironment which lead to the exhaustion of tumor-infiltrating lymphocytes and the failure to eliminate the cancer cells. We aim to investigate: 1) if CD8+ T cells expressed neuropeptide receptors; 2) whether this expression varies in co-culture with neurons; and 3) if CD8+ T cells expression levels of immune checkpoint receptors is increased when co-cultured with sensory neurons. By understanding which neuropeptides are responsible for the inhibition of immune cells, it is possible to envisage new therapeutic strategies against certain cancers. In order to understand these mechanisms many techniques are used in Dr. TALBOT's laboratory, namely: neurons and lymphocytes culture, fluorescence microscopy, calcium imaging, qPCR and flow cytometry.



Marie POTIER

NUVAC INC.

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Noël GAUTHIER**

Analyse de données lors du traitement d'eaux usées municipales par un consortium de bactéries (I) et Développement de projets pour le traitement de sols et cours d'eau (II)

La dépollution des eaux usées est un enjeu majeur au Canada, notamment au Québec. L'entreprise NUVAC Eco Science Inc. propose une approche biotechnologique pour répondre aux attentes des municipalités, des industries et des particuliers liés à cette problématique, mais aussi pour le traitement des sols et cours d'eau. Lors de ce stage, j'ai réalisé le suivi de plusieurs dossiers, dont l'optimisation de la station d'épuration de la ville de Magog, plus précisément de leur système biologique de digestion des boues dans des bassins d'oxydations. J'ai également participé au développement de projets pour le traitement des sols et cours d'eau de l'Aéroport International Pierre-Elliott-Trudeau, géré par ADM (Aéroports de Montréal), en particulier la dégradation de l'éthylène glycol et la diminution de la DCO (demande biochimique en oxygène). Pour l'optimisation du système de digestion des boues de Magog, mon rôle a été d'analyser les données mesurées par la station et d'apporter un bilan après 3 mois de traitement par le BactaGène™ (NUVAC Eco Science Inc.), composé d'un consortium de Bacillus et Pseudomonas. Concernant le développement de projets pour ADM, mes responsabilités étaient multiples : échanger avec les ingénieurs civils et en environnement d'ADM pour étudier la faisabilité des projets, rédiger les protocoles correspondants et suivre les démarches administratives auprès du Ministère de l'Environnement et du Changement Climatique. J'ai aussi été amenée à travailler avec l'Université de Sherbrooke pour la conception d'un projet de recherche universitaire autour de la biodégradation de l'éthylène glycol.

VALCOURT • Canada

03/06/2019 → 27/09/2019



Analysis of data in the treatment of municipal wastewater by a mixture of bacteria (I) and Development of projects for the treatment of soils and watercourses (II).

Pollution of sewage is a major issue in Canada, including in Quebec. NUVAC Eco Science Inc. offers a biotechnological approach to meet the expectations of municipalities, industries and individuals concerned by this issue, as well as for soil and watercourse treatments. During this internship, I handled several files, including the optimization of the sewage treatment plant of the city of Magog, particularly their biological system of digestion of sludge in oxidation ponds. I also participated in the development of projects for the treatment of Pierre-Elliott-Trudeau International Airport's soils and watercourses, managed by ADM (Aéroports de Montréal), especially for the degradation of ethylene glycol and the reduction of COD (biochemical oxygen demand). For the optimization of the Magog sludge digestion system, my role was to analyze the data measured by the station and provide a report after 3 months of treatment with BactaGène™ (NUVAC Eco Science Inc.), composed of a mixture of Bacillus and Pseudomonas. Concerning the development of projects for ADM, my responsibilities were multiple: to exchange with the civil and environmental engineers of ADM to study the feasibility of the projects, to write the corresponding protocols and to follow the administrative steps with the Ministère de l'Environnement et du Changement Climatique. I also worked with Sherbrooke university to design a research project on the biodegradation of ethylene glycol.



Mathilde REZE

3A-Classique

INSERM UMR 1043

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Nathalie JONCA**

Production de l'enzyme PNPLA1 pour l'identification de partenaires moléculaires par la technique de GST pull-down.

L'épiderme constitue une protection naturelle essentielle de l'organisme contre la déshydratation ainsi que les agressions physiques, chimiques et biologiques. Les lipides présents dans les couches superficielles de l'épiderme, majoritairement des céramides, jouent un rôle majeur dans la fonction barrière de la peau, notamment pour le maintien d'un gradient hydrique optimal dans l'organisme. Les ichtyoses congénitales autosomiques récessives (ARCI) sont des maladies monogéniques rares de la peau causées par des mutations au sein de gènes impliqués dans le métabolisme des ω -O-acylcéramides. L'un de ces gènes, PNPLA1, code pour une enzyme catalysant la dernière étape de synthèse des ω -O-acylcéramides.

Cependant l'organisation moléculaire et cellulaire de cette étape est encore mal connue.

L'objectif de ce stage est d'identifier des partenaires potentiels de PNPLA1 grâce à la technique de GST pull-down, afin de déchiffrer les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de cette ultime réaction. La technique de GST pull-down consiste à immobiliser la protéine PNPLA1 sur une colonne grâce à une étiquette GST, puis de retenir, par chromatographie d'affinité réalisée avec un extrait de protéines épidermiques, d'éventuelles protéines capables d'interagir avec PNPLA1. Mon travail a donc consisté à créer, à partir d'un premier vecteur contenant l'ADN complémentaire du gène PNPLA1 couplé à la séquence codante de la GST,

un vecteur témoin codant la GST seule. Ces deux vecteurs ont ensuite été clonés dans des bactéries, purifiés, puis transfectés dans des cellules humaines afin de produire les protéines nécessaires à la technique de GST pull-down.

TOULOUSE • France

06/05/2019 → 27/09/2019



Production of PNPLA1 enzyme for the identification of molecular partners by the GST pull-down technique.

The epidermis is a natural protection of the body, essential against dehydration as well as physical, chemical and biological aggression. Lipids from the upper epidermal layers, mainly composed of ceramides, play a major role in the barrier function of the skin, particularly for the maintenance of an optimal hydric gradient within the body. Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) are rare monogenic skin diseases caused by mutations in genes involved in ω -O-acylceramides metabolism. One of these genes, PNPLA1, codes for an enzyme catalyzing the last step of ω -O-acylceramides synthesis. However, the molecular and cellular organization of this stage is still poorly understood.

The objective of this internship is to identify potential partners of PNPLA1 thanks to the GST pull-down technique, in order to decipher the molecular mechanisms involved during this ultimate reaction. The GST pull-down technique involves immobilizing the PNPLA1 protein on a column using a GST tag, then holding back, by affinity chromatography performed with an epidermal protein extract, any proteins capable of interacting with PNPLA1. My job was therefore to create, from a first vector containing the complementary DNA of PNPLA1 gene in frame with the coding sequence of GST, a control vector encoding GST alone. These two vectors were then cloned into bacteria, purified, and transfected into human cells to produce the proteins required for the GST pull-down technique.



Guillaume RUELLE

IFREMER

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Thomas LACOUR**

Acquisition du Phosphore chez *Tisochrysis lutea*.

L'Ifremer est un organisme de recherche dont les activités sont centrées sur l'exploration des océans et la compréhension de la dynamique des écosystèmes marins. Les laboratoires du centre de Nantes sont, pour la plupart, rattachés au département « Ressources biologiques et environnement » et couvrent des thématiques de recherche très variées telles que l'halieutique, l'écotoxicologie, l'aquaculture, la microbiologie et les biotechnologies. Le laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues, dans lequel j'ai réalisé mon stage, a pour mission d'améliorer la compréhension des mécanismes et stratégies des micro-algues pour faire face aux variations de leur environnement.

L'objectif de mon stage a été d'étudier l'acquisition du phosphore chez une micro-algue haptophyte, *Tisochrysis lutea*. Pour faire face aux limitations en phosphore qu'elle peut rencontrer dans son environnement, cette micro-algue dispose de transporteurs pour le phosphate inorganique et excrète des phosphatases alcalines qui minéralisent le phosphate organique en phosphate inorganique afin de le rendre disponible pour la micro-algue. Afin d'étudier l'influence de la disponibilité en phosphore chez *T.lutea*, plusieurs cultures ont été réalisées en faisant varier la disponibilité en phosphore inorganique. Les échantillons récupérés ont permis d'étudier l'expression de gènes impliqués dans le transport du phosphate inorganique ainsi que ceux codant pour des phosphatases alcalines à l'aide de la PCR quantitative. L'étude des pools intracellulaires et extracellulaires de phosphate (organique et inorganique) a également été réalisée via des analyses biochimiques variées telles que la WET-Oxydation. Les résultats obtenus participeront à une meilleure compréhension des phénomènes de limitations qui affectent le phytoplancton. Ces études sont donc indispensables à l'étude et à la sauvegarde des écosystèmes côtiers.

NANTES • France

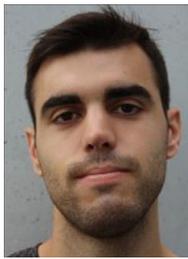
03/06/2019 → 11/10/2019



Acquisition of phosphorus in a haptophyte micro-algae.

Ifremer is a research organization whose activities focus on ocean exploration and understanding of the dynamics of marine ecosystems. The laboratories of the facility of Nantes are mostly attached to the "Biological Resources and Environment" department and cover a wide range of research topics such as fisheries, ecotoxicology, aquaculture, microbiology and biotechnology. The Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues (Algae Physiology and Biotechnology Laboratory), in which I completed my internship, has the mission of improving the understanding of the mechanisms and strategies of micro-algae to cope with the variations of their environment.

The objective of my internship was to study the acquisition of phosphorus in a haptophyte micro-alga, *Tisochrysis lutea*. To cope with the phosphorus limitations it may encounter in its environment, this micro-algae produces transporters with a high affinity for phosphorus and excretes alkaline phosphatases that mineralize organic phosphorus to make it available for micro-algae. In order to study the influence of phosphorus availability in *T.lutea*, several cultures were grown by varying the availability of inorganic phosphorus. The recovered samples were used to study the expression of genes involved in the transport of inorganic phosphate as well as those coding for alkaline phosphatases using quantitative PCR. The study of intracellular and extracellular phosphate pools (organic and inorganic) was also carried out via various biochemical analyses such as the WET-Oxidation method. The results obtained will contribute to a better understanding of the limitation phenomena affecting phytoplankton. These studies are therefore essential for the study and preservation of coastal ecosystems.



Florent SAGNE

LFB Biomanufacturing

Tuteur(s) / Supervisor(s): **David BALBUENA**

Caractérisation de bioréacteur à usage unique et développement d'une méthode de stripping du CO₂.

Les progrès techniques et industriels dans le domaine de la culture cellulaire eucaryote ont amené à une augmentation des concentrations cellulaires lors de procédé de production. Ces innovations ont engendré de nouvelles problématiques dont l'augmentation du CO₂ dissous (dCO₂) au sein du milieu de culture. Les premières recherche ont montré l'impact négatif de l'accumulation de dCO₂ sur les cellules et le produit obtenu. Le taux de croissance et la productivité sont les deux facteurs les plus négativement influencés par l'augmentation de CO₂dissous. La quantification du dCO₂ repose sur la relation qui relie concentration et pression des gaz dissous dans un liquide (Loi de Henry). Ainsi par ce principe il est possible de quantifier le CO₂dissous en déterminant la pCO₂. L'objectif de ce stage était de caractériser la vitesse d'élimination du CO₂ dans différentes conditions données. Le coefficient de transfert volumique (KLa) est le facteur qui a été choisi pour évaluer l'efficacité d'élimination du CO₂. Le KLa CO₂ a été déterminé par une méthode dite dynamique ; le bioréacteur est saturé en CO₂, puis le système d'aération est mis en place. La décroissance de la pCO₂en fonction du temps permet de définir le KLa qui se traduit comme l'opposé du stripping du CO₂. Les paramètres étudiés sont liés au système d'aération de la poche. L'un des fournisseurs du LFB, Thermofisher, a développé un nouveau système nommé drilled-holesparger (DHS). Le DHS est une amélioration du système d'injection de gaz composé d'un micro et macro sparge. Ce dernier est remplacé par un disque perforé au laser à un diamètre bien défini. Cette modification permet d'obtenir des bulles plus larges et d'optimiser l'élimination du CO₂. Les conditions d'essai ont été déterminé grâce au logiciel Design-Expert, via à un plan d'expérience à 3 facteurs : l'agitation, le débit du micro sparge, le débit du DHS. 16 essais ont été réalisés selon le protocole écrit au préalable. Les données brutes ont été traitées afin d'obtenir les KLa pour chacun des essais. Par la suite une analyse statistique exprimé sous forme de surface de réponse a été effectuée et un modèle a pu être déterminé grâce à l'ensemble des données. Valider ce modèle permettra une utilisation lors d'une production industrielle afin de gérer la problématique d'accumulation de CO₂.

ALES • France

03/06/2019 → 30/09/2019



Single use bioreactor characterization and CO₂ stripping method development.

Technical and industrial progress in eukaryote cell culture bring to a cell concentration increase in production. This innovation caused new problematics like dissolve carbon dioxide increasing (dCO₂) in the medium. First research shows negative incidence of dCO₂ accumulation on cell and final product. Growth rate and specific productivity are the two factors the most negatively influenced by high concentration of liquid dioxide. dCO₂ quantification is based on a relation who link dissolve gas concentration and pressure in a medium (Henry's law). By this principle, is possible to quantify dCO₂ by pCO₂ determination. The internship aim is CO₂ stripping characterization in different conditions. The mass volumetric transfer coefficient (KLa) is the constant chosen for stripping evaluation. KLa CO₂ was determined by dynamic method; the bioreactor is saturated in dioxide, then aeration system is started. The pCO₂decreasing is follow over time and allow to determine KLa coefficient. This constant can be traduced like the opposite of CO₂ stripping. Studies parameters are related to aeration system. One of the LFB suppliers, Thermofisher, developed a new system named drilled holesparger (DHS). The DHS is an improvement of actual system, composed of micro and macrosparge. The last one is replaced by a laser perforated disk at precise diameter. This modification enables to obtain larger size bubble and optimise CO₂ stripping. Test conditions have been defined thanks to Design Expert software and a three factors design experiment was built (Agitation, microsparge debit, DHS debit). 16 runs have been realized according to a protocol previously written. Raw data have been treated to obtain KLa for each run. Afterward a statistical analysis, a surface response has been defined and a model established with all data. A model validation results in an effective utilisation in industrial process to manage CO₂ accumulation.



Thomas SAILLARD

CANCER RESEARCH UK Manchester Institute

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Renaud MEVEL**

Génération de lignées cellulaires knock-out à l'aide de CRISPR/Cas9 afin d'étudier la famille de facteur de transcription RUNX.

Cancer Research UK (CRUK) est une organisation charitable de recherche contre le cancer. J'ai effectué mon stage au sein du groupe de recherche "Stem Cell Biology", dirigé par le Professeur Georges Lacaud et appartenant au CRUK Manchester Institute. Ce groupe de recherche étudie la contribution de facteurs de transcription tels que RUNX1 et MOZ dans le développement du système hématopoïétique et leur influence dans la mise en place de cancers. L'objectif de mon stage était de générer des modèles cellulaires déficients pour RUNX1 et/ou RUNX2 afin d'étudier leurs rôles dans le cancer de la prostate et dans le développement et l'homéostasie de ce tissu. A l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, j'ai effectué le knock-out de RUNX1 et de RUNX2 au sein de deux modèles cellulaires : une lignée métastatique de cancer de la prostate et une lignée murine de cellules souches embryonnaires. Les ARN guides ciblant spécifiquement les séquences de RUNX1 et RUNX2 ont été clonés dans un plasmide contenant le gène codant pour la D10A mutant Cas9 nickase ainsi que le gène rapporteur codant pour la GFP. Après transfection, les cellules exprimant fortement la GFP ont été triées par cytométrie en flux afin d'isoler et d'amplifier des populations clonales. La caractérisation des délétions a été effectuée par PCR de génotypage et séquençage de l'ADN génomique, ainsi que par western blot pour confirmer l'absence de protéine produite. Les lignées cellulaires générées seront utilisées pour étudier l'impact de l'absence de ces facteurs de transcription dans différents tests cellulaires fonctionnels.

Manchester • Royaume-Uni

03/06/2019 → 25/10/2019



MANCHESTER INSTITUTE



Generation of knockout cell lines using CRISPR/Cas9 to study the role of RUNX transcription factors.

Cancer Research UK (CRUK) is a charitable organisation aiming to prevent cancer. I joined the Stem Cell Biology group of the CRUK Manchester Institute headed by Professor Georges Lacaud, a research group focused on studying how transcription factors such as RUNX1 and MOZ contribute to haematopoietic development and tumorigenesis. My internship consisted of establishing cellular models lacking RUNX1 and/or RUNX2 to study the role of the RUNX transcription factors in prostate cancer, and during the development and homeostasis of the normal prostate epithelium. Thus, I engineered RUNX1 and RUNX2 knockouts by using the CRISPR/Cas9 tools on a metastatic prostate cancer cell line as well as mouse Embryonic Stem cells. Single-guide RNAs targeting specifically RUNX1 and RUNX2 were cloned into plasmids containing the D10A mutant Cas9 nickase gene and a fluorescent reporter gene (GFP). Following transfection, cells expressing high levels of GFP were sorted as single cells by flow cytometry to isolate and amplify clonal populations. Deletions were characterised by genotyping PCR, sequencing of genomic DNA, and western blots were performed to confirm the absence of protein produced. These cell lines will be used to study the impact of the loss of these transcription factors in a wide range of functional cellular assays.



Maxime SALMON

Institut Européen de Chimie et Biologie IECB

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Jérémy BURATTO**

Production et caractérisation d'un complexe protéine-foldamère impliqué dans le cancer.

Les interactions protéine-protéine interviennent dans de très nombreuses fonctions cellulaires mais sont également responsables de multiples maladies. L'équipe du Dr Gilles Guichard s'est en partie consacré à l'étude des interactions protéiques d'un complexe intervenant dans le cancer: HDM2-p53.

La protéine p53, suppresseur d'activité tumorale, a un rôle essentiel lorsqu'un stress ou un dysfonctionnement cellulaire apparaît. Cette protéine est capable d'interagir avec l'ADN, de stopper le cycle cellulaire et de provoquer l'apoptose de la cellule si les dysfonctionnements ne sont pas réparés. HDM2, protéine qui régule négativement p53, est surexprimée dans 50 % des cas de cancers humains. C'est pourquoi le principal objectif de cette étude est d'inhiber cette interaction. La protéine p53 est substituée par un foldamère uréido-peptidique capable de mimer son interaction avec HDM2 qui est produite de façon recombinante.

Les foldamères sont des molécules capables d'un auto-assemblage en une structure secondaire stable. Ces molécules sont chimiquement synthétisées et composées d'acides aminés naturels et de résidus « urées » rendant le complexe plus stable. Cette stabilité est testée dans le but de concevoir un inhibiteur thérapeutique durable de la protéine HDM2 et de permettre à p53 d'accomplir son rôle de suppresseur tumoral.

Au cours de cette étude, la protéine HDM2 a été produite de façon recombinante chez E. coli de type BL21, avant d'être purifiée sur colonne de chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés et sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Les complexes HDM2-foldamères ont été analysés par différentes méthodes analytiques que sont la cristallographie, le dichroïsme circulaire ou encore le titrage calorimétrique isotherme.

PESSAC • France

03/06/2019 → 28/09/2019



Production and characterization of a protein-foldamer complex involved in cancers

Protein-protein interactions are not only involved in several cellular functions but are also responsible for many diseases.

The team of Dr Gilles Guichard is focused on the study of proteic interactions of a complex involved in cancer: HDM2-p53.

The protein p53, namely tumor suppressor, has a crucial role when a cell stress or a dysfunction appears. This protein is able to interact with DNA, to stop the cellular cycle and to induce the apoptosis of the cell if the damages are not repaired. HDM2, a protein which regulates p53 negatively is overexpressed in more than 50% of human cancers. The goal of this study is therefore to inhibit this interaction. The p53 is substituted by a ureido-peptidic foldamer which is able to mimic its interaction with the recombinantly produced protein HDM2.

Foldamers are molecules capable of self-assembly in a stable secondary structure. These molecules are chemically synthesized and have simultaneously natural amino acids and "urea" residues to make the complex more stable. This stability is checked in order to develop a sustainable therapeutic inhibitor of the protein HDM2 and to allow p53 to accomplish its tumor suppressor role.

During this project, the protein HDM2 was recombinantly produced in BL21 E.coli, then was purified on immobilized metal-ion affinity chromatography and on size exclusion chromatography. The complexes HDM2-foldamers were analysed with different analytic methods such as crystallography, circular dichroism or isothermal titration calorimetry.



Marilène TRANCART

INSTITUT DE RECHERCHE BIOMEDICALE DES ARMEES (IRBA)

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Guilhem CALAS**

Evaluation in vitro et in vivo de l'efficacité thérapeutique de réactivateurs de cholinestérases inhibées par des composés organophosphorés.

En dépit de la signature en 1997 de la convention internationale sur l'interdiction des armes chimiques, qui prohibe la synthèse et l'utilisation d'armes chimiques, la menace de conflits et d'attaques terroristes où seraient employés de telles armes demeure d'actualité. Parmi celles-ci, les composés chimiques organophosphorés (OPs), de par leur capacité à perturber l'influx nerveux, sont considérés comme des neurotoxiques. Leur effet inhibiteur de l'activité catalytique d'enzymes telles que l'acétylcholinestérase ou la butyrylcholinestérase, est à l'origine d'un syndrome cholinergique. L'institut de recherche biomédicale des armées (IRBA) vise à développer de nouveaux antidotes encore plus efficaces contre les OPs que les dispositifs actuels qui ne présentent pas une protection optimale contre tous les neurotoxiques. Le projet a porté sur l'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'un candidat-réactivateur de l'acétylcholinestérase inhibée, l'AB639, face à quatre différents OPs. Cette efficacité a été comparée à celle d'un réactivateur de référence, la pralidoxime (2-PAM), actuellement utilisé dans les dispositifs médicaux en dotation dans l'armée française. Dans un premier temps, les constantes cinétiques de réactivation in vitro de l'AB639 ont été déterminées sur les cholinestérases inhibées. Dans un second temps, l'efficacité du candidat-réactivateur a été testée in vivo sur des souris intoxiquées aux OPs. Ainsi, les indices de protection de l'AB639 ont été déterminés. Les résultats obtenus montrent que l'AB639 réactive de manière modérée les cholinestérases inhibées par les différents OPs in vitro et n'offre pas, contre l'ensemble des toxiques, une protection in vivo supérieure à la molécule de référence, le 2-PAM.

BRETYGNY-SUR-ORGE • France

03/06/2019 → 27/09/2019



In vitro and in vivo therapeutic efficacy evaluation of reactivators of organophosphorus compounds-inhibited cholinesterase.

Despite the international convention on the prohibition of chemical weapons signed in 1997, which forbids the synthesis and use of chemical weapons, the threat of conflicts and terrorist attacks involving such weapons still exists. Among these, organophosphorus-nerve agents (OPs) that disrupt nerve impulses, are neurotoxic. Their inhibitory effect on the catalytic activity of enzymes such as acetylcholinesterase or butyrylcholinesterase leads to a cholinergic crisis. The french armed forces research institute aims to develop new and more effective antidotes against NOP exposure than those currently available with an optimal protection against all neurotoxics. The aim of the project was to evaluate the protective efficacy of a new reactivator of the inhibited acetylcholinesterase, the AB639 oxime, against four different OPs. This efficacy has been compared to that of a reference reactivator, pralidoxime (2-PAM), currently used in medical devices provided by the French army. First, the in vitro reactivation kinetic constants of AB639 were determined for inhibited cholinesterases. In a second step, the efficacy of the candidate-reactivator was tested in vivo in mice poisoned with OPs. Thus, protective index of AB639 were determined. The results obtained show that AB639 moderately reactivates the cholinesterases inhibited by the different OPs in vitro and does not offer an in vivo superior protection against all toxics in comparison to the reference molecule, the 2-PAM.



Roxane VALFORT

LALLEMAND BIOFUELS AND DISTILLED SPIRITS

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Valérie GEOFFROY**

Optimisation de la production, à l'échelle laboratoire, de souches de levures présentant des avantages en termes de fermentation ou de production moléculaire.

Les qualités fermentaires des levures sont utilisées dans de nombreux domaines et la demande pour leur production industrielle ne fait qu'augmenter avec la découverte de nouvelles souches capables de produire des arômes particuliers ou des molécules intéressantes. Or, si les conditions de fermentation de certaines souches de levures du genre *saccharomyces* sont bien connues, d'autres souches, génétiquement modifiées ou non le sont moins et leur production peut s'avérer plus difficile, voire inadaptée au milieu industriel. Les missions principales du laboratoire de procédés Lallemand sont donc d'optimiser la culture de ces souches de levures pour les domaines de l'œnologie, la brasserie, la boulangerie ou encore la nutrition animale en réponse à une demande interne ou externe à Lallemand. La durée des essais de production d'une souche particulière varie selon l'objectif à atteindre, elle n'est parfois que de quelques semaines, me permettant ainsi de mener à bien deux projets différents durant ce stage de quatre mois. Ces deux principales études reposaient essentiellement sur la culture fed-batch de levures de boulangerie puis d'œnologie en bioréacteur de 20L. Dans le cadre de ces projets, les étapes de conditionnement telles que la séparation, la filtration et le séchage des levures ainsi que des tests de quantification de protéines et d'analyses HPLC prenaient part entière aux expérimentations menées lors de mes recherches.

MONTREAL • Canada

13/05/2019 → 13/09/2019



Optimization of production, at laboratory scale, of yeast strains with special qualities for fermentation or molecular production.

The fermentative qualities of yeasts are used in many fields and the demand for their industrial production constantly increase because of the discover of new strains able to produce special flavours or interesting molecules. While, even if the fermentation conditions of strains such as *Saccharomyces* are well-known, this is not the case for others strains, genetically modified or not and their production can be more difficult or even unsuitable for industrial environment. The main tasks of the Lallemand process laboratory are to optimize the culture of these yeast strains for the fields of oenology, brewery, bakery or animal nutrition in response to internal or external request from Lallemand. The duration of the production trials of a particular strain varies according to the objective to be reached, it needs sometimes only a few weeks and it is what allowed me to carry out two different projects during this four-month internship. These two main studies were essentially based on fed-batch culture in 20L bioreactor for the bakery then oenology yeasts. As part of these projects, conditioning steps such as separation, filtration and drying of yeasts as well as protein quantification tests and HPLC analyses had an integral part in the experiments conducted during my research.