



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2018

THESE n°96

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 5 septembre 2018

par

M. DUROUS Laurent

Né le 28 juin 1992

A Villeurbanne, France

***ETAT DE L'ART DES BIOPROCEDES VACCINAUX ANTI-INFLUENZAE ET
APPORTS DE LA STRATEGIE DES PARTICULES PSEUDO-VIRALES***

JURY

Pr Marie-Alexandrine BOLZINGER

Pr Cyril PAILLER-MATTEI

Dr Stefan CONDRUZ

Dr Emma PETIOT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon
LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDJ-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

-
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Charlotte BOUARD (86^{ème} section)
Madame Laure-Estelle CASSAGNES(85^{ème} section)
Monsieur Karim MILADI (85^{ème} section)
Madame Laurence PAGES (87^{ème} section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

A mes amis du lycée, et d'après ! Pour toutes ces années, ces réveillons et soirées d'été passés depuis les bancs du lycée !

Cynthia, Nicolas, Sarah, Aliénor, Valentine, Adrien, Arnaud, Margot, Xavier, Julie, Marine et Pierre

A mes amis de la fac, pour ces cours (actifs), ces TPs et soirées passés ensemble !

Stefan, Myriam, Matthieu, Erwan, Charlélie, Eric, Paul et Olivier

A mes amis de Montréal, pour avoir su agrémenter ces hivers et semestres intenses à coup de poutine, de bières artisanales et canapés moelleux !

Stefan, Camille, Coline, Vincent et Rémi

Au laboratoire de Bactériologie des Hôpitaux Est, et notamment le Dr. Olivier Dauwalder qui m'a donné un goût pour l'analytique durant ma cinquième année hospitalo-universitaire

Au laboratoire Virpath pour m'avoir accueilli et influencé

Anaïs, Andrès, Aurélien, Blandine, Thomas, Olivier et Manuel

Au laboratoire Gembas, pour m'avoir également accueilli et mis la puce à l'oreille

Christophe, Emma, Chloé, Léa, Yani, Pierre, Cloé, Alizée, Julien, Béa, Bastien, Céline, Hema et tous les autres !

A ma famille, pour son soutien durant ces (longues) études,

Ma mère qui m'a donné un goût pour la recherche en commençant par celle des champignons

Mon père qui m'a donné un goût pour la critique constructive en commençant par celle des champignons cuisinés

A Audrey, Vincent, Margaux et Gaspard, vous serez les prochains à y passer !

Un grand merci également aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail :

Au Pr Marie-Alexandrine Bolzinger, pour avoir accepté de présider ce jury et se plonger dans cette thèse durant ses vacances, malgré un sujet relativement éloigné de la pharmacie galénique.

Au Pr Cyril Pailler Mattei, pour son encadrement dans la filière Pharmacien-Ingénieur à Lyon et son suivi jusqu'à la participation à cet exercice final. Cette filière m'a permis de m'ouvrir à un univers autre que la pharmacie, de goûter à des enseignements plus « techniques » en génie chimique à Polytechnique Montréal, que j'espère pouvoir mettre à profit dans ma vie professionnelle future.

Au Dr Emma Petiot pour son encadrement ces dernières années et de m'avoir fait partager ce sujet de recherche.

Au Dr Stefan Condruz, pour avoir accepté d'endosser le rôle de directeur de thèse. Pour tes conseils, ton soutien et les bons moments autant durant les années à Montréal qu'à Lyon. Après t'avoir vu écrire et passer ta thèse c'est à mon tour d'être en face de toi !

Table des matières

PARTIE I :	1
Le virus influenza et les procédés de production de vaccin antigrippal	1
I. Le virus Influenza	2
I.1. Structure et morphologie	2
I.1.1. Le virus Influenza	2
I.1.2. Les glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine et la neuraminidase	4
I.2. Classification	6
I.3. Clinique et intérêt en matière de santé publique	7
I.3.1. La clinique de l'infection virale par <i>Influenza</i>	7
I.3.2. Epidémiologie du virus <i>Influenza</i>	7
I.4. Les mécanismes évolutifs du virus <i>Influenza</i>	8
II. La vaccination antigrippale	10
II.1. Histoire de la vaccination	10
II.2. La production de vaccins influenza	12
II.2.1. Evolution de la composition vaccinale	12
II.2.2. Les différents types de vaccins influenza	13
II.2.3. Le procédé d'ovoculture	15
II.2.3.a. Historique	15
II.2.3.b. Stratégie de production	16
II.2.3.c. Limitations	23
II.2.4. Les procédés par culture cellulaire	24
II.2.4.a. Les procédés de culture virale par infection	25
II.2.4.b. Les procédés d'expression de protéines et d'antigènes recombinants	26
II.2.5. La stratégie des particules pseudo-virales (VLPs)	27
PARTIE II : Le cycle viral infectieux et les études structurales basées sur le modèle des particules pseudo-virales d'influenza	30
I. Le cycle viral infectieux	31
I.1. Vue d'ensemble et stratégies vaccinales associées	31
I.2. Interactions entre le virus <i>Influenzae</i> et l'épithélium respiratoire	33
I.3. Entrée virale	34
I.4. Transcription, réplication virale et transport	36
I.5. Assemblage viral et bourgeonnement	37
II. Apport du modèle d'étude des particules pseudo-virales dans la caractérisation du processus de bourgeonnement d'influenza	39

PARTIE III : Etat de l'art des bioprocédés de production de particules pseudo-virales d'influenza	44
I. Introduction.....	45
II. Les particules pseudo-virales d'influenza : procédés de production et de purification	45
III. Contributions de l'article.....	98
BIBLIOGRAPHIE.....	99

Table des figures

Figure 1 : Structure du virus influenza A.....	3
Figure 2 : Structure de l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) du virus influenza par microscopie électronique (au niveau de la membrane virale, en haut à gauche) et cristallographie aux rayons X. Tiré de (9).....	5
Figure 3 : Phénomènes de glissement (shift) et cassure (drift) antigénique du virus Influenza (Source : National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)).....	9
Figure 4 : Gauche : Pasteur examinant une moelle de lapin rabique (Albert Edelfelt (1854-1905) Louis Pasteur, Huile sur toile, 1885) ; Droite : Flacon avec moelle épinière de lapin rabique suspendue au-dessus de morceaux de potasse.....	11
Figure 5 : Evolution du vaccin en fonction de l'évolution des souches circulantes depuis 1933. Tiré de (15).....	12
Figure 6 : Composition des différents types de vaccins influenza. WIV : Wild Inactivated Virus. A partir de (29).....	15
Figure 7 : Procédés de préparation d'une souche vaccinale réassortante. Gauche : Technique de co-infection. Droite : Technique de génétique inverse (Source : National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)).....	17
Figure 8 : Procédés de production et de purification de lots de vaccin Influenzae monovalents. Tiré de (38).....	18
Figure 9 : Gauche : Techniques d'inoculation virales d'œuf embryonnés. La technique varie suivant le virus cultivé. Droite : Principe de séparation par ultracentrifugation zonale. Tiré de (44).....	19
Figure 10 : Calendrier de la production du vaccin antigrippal pour les deux hémisphères. Tiré de (29).....	22
Figure 11 : Les différents types de particules pseudo-virales. Tiré de (59).....	28
Figure 12 : Le cycle infectieux du virus influenza et les mécanismes immunitaires associés. Tiré de (50).....	32
Figure 13 : Représentation de résidus d'acides sialiques à l'extrémité d'une glycoprotéine membranaire. Tiré de (64).....	33
Figure 14 : Distribution globale des glycanes avec acide sialique terminal au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire de différentes espèces (par coloration à l'aide de différentes lectines Maackia amurensis agglutinin (MAA)). Tiré de (11).....	34
Figure 15 : Entrée du virus Influenzae. Tiré de (72).....	35
Figure 16 : Transport des complexes vRNP et bourgeonnement viral. Tiré de (72).....	36
Figure 17 : Modèle du bourgeonnement du virus influenza. A : regroupement de HA et NA par l'intervention de radeaux lipidiques ; B : Elongation de la particule virale par polymérisation de M1 ; C : Scission membranaire par concentration de M2. Tiré de (68).....	39

Table des tableaux

Tableau 1 : Génome et fonctions principales des protéines d'Influenza A (A/Puerto Rico/8/1934). Tiré de (7).....	4
Tableau 2 : Critères d'évaluation des lots de vaccin monovalents. Les références des méthodes à appliquer selon la Pharmacopée Européenne pour la caractérisation des lots vaccinaux sont indiquées. * La SRID est la seule technique reconnue par l'OMS pour la caractérisation des lots vaccinaux en termes de quantité de HA. A partir de (45).	21
Tableau 3 : Vaccins antigrippaux produits par ovoculture. Issu de (47)	23
Tableau 4 : Caractéristiques comparées des deux plateformes supportant la production de vaccins influenza autorisées à l'heure actuelle. * pour les souches H1N1 pandémique/HPAI ** Production mondiale de vaccin trivalent inactivé pour la saison 11/12 selon (36).....	25
Tableau 5 : Liste des vaccins antigrippaux commercialisés produits par culture cellulaire. Issu de (47) et (29)	26
Tableau 6 : Exemples de vaccins prophylactiques produits à partir de particules pseudo-virales (VLPs).....	29
Tableau 7 : Etudes structurales réalisées au sujet de l'expression in-vitro des protéines d'influenza en cellule mammaire.....	40

Liste des abréviations

ARN : Acide Ribonucléique

ANSM : Agence National de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

CDC : Center for Disease Control and prevention

CNR : Centre National de Référence

EGFR : *Epithelial Growth Factor Receptor* (Récepteur du facteur de croissance épidermique)

EMA : European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)

FDA : *Food and Drug Administration*

HA : Hémagglutinine

HPAI : *Highly Pathogenic Avian Influenza* (Virus Influenza hautement pathogène)

HBV : Virus de l'Hépatite B

HPV : Papillomavirus humain

MDCK : Madin–Darby Canine Kidney

NA : Neuraminidase

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

PPVs ou **VLPs** : Particules Pseudo-Virales ou *Virus-like Particles*

PCR : Réaction en chaine par polymérase ou *Polymerase Chain Reaction*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SRID : *Single Radial Immunodiffusion*

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TIV : *Trivalent inactivated vaccine* (Vaccin Trivalent Inactivé)

WIV : Wild Inactivated Virus (Virus vivant atténué)

PARTIE I :

Le virus influenza et les procédés de production de vaccin antigrippal

I. Le virus Influenza

Le virus influenza est l'agent pathogène à l'origine de la grippe, maladie infectieuse causant des épidémies saisonnières dont la morbidité s'élève entre 2 et 7 millions de personnes en France. Les estimations révèlent 3 à 5 millions de cas de maladies graves dans le monde, et une mortalité estimée entre 250 000 et 500 000 personnes chaque saison (1).

I.1. Structure et morphologie

I.1.1. Le virus Influenza

Le virus influenza (*Myxovirus influenzae*) est un virus à ARN enveloppé appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. La **Figure 1** présente la structure du virus influenza, tandis que le **Tableau 1** détaille ses différentes protéines. Ainsi, *M. influenzae* est classé selon 3 types (A, B ou C). Ce virus est formé de plusieurs composants majeurs, à savoir : une enveloppe comportant les 3 glycoprotéines membranaires de la grippe (hémagglutinine HA, neuraminidase NA et canal ionique M2), une couche intermédiaire de protéines matricielles M1 et le génome viral présent sous la forme de huit (type A) ou sept (type B) nucléocapsides de symétrie hélicoïdale. Chaque nucléocapside (ou ribonucléoprotéine virale) résulte de l'association d'un segment d'ARN viral (ARN simple brin, polarité négative) avec plusieurs nucléoprotéines (PB) (2,3). Un complexe polymérase est également associé à chaque nucléocapside. Ce dernier est formé des protéines PA, PB₁ et PB₂ (2,3). Des protéines non structurales NS1 et NS2/NEP sont également retrouvées à l'intérieur du virus (4). Au niveau du génome viral, six segments de gènes codent pour les protéines virales PA, PB₁, PB₂, PA, HA, NP et NA tandis que deux autres gènes subissent un épissage afin de donner quatre autres protéines virales après traduction (le gène M donne M1 et M2, le gène NS donne les protéines NS1 et NS2 (ou NEP) (5).

Concernant les virus influenza A, ces derniers sont divisés en sous-types en fonction de leurs antigènes de surface. Ces antigènes correspondent aux glycoprotéines membranaires incorporées dans l'enveloppe virale et jouant un grand rôle dans la pathogénicité du virus. L'hémagglutinine virale (HA) est majoritairement présente en surface (env. 80% des glycoprotéines de surface) vis-à-vis de la neuraminidase (env. 17%), et de M2 minoritaire (3).

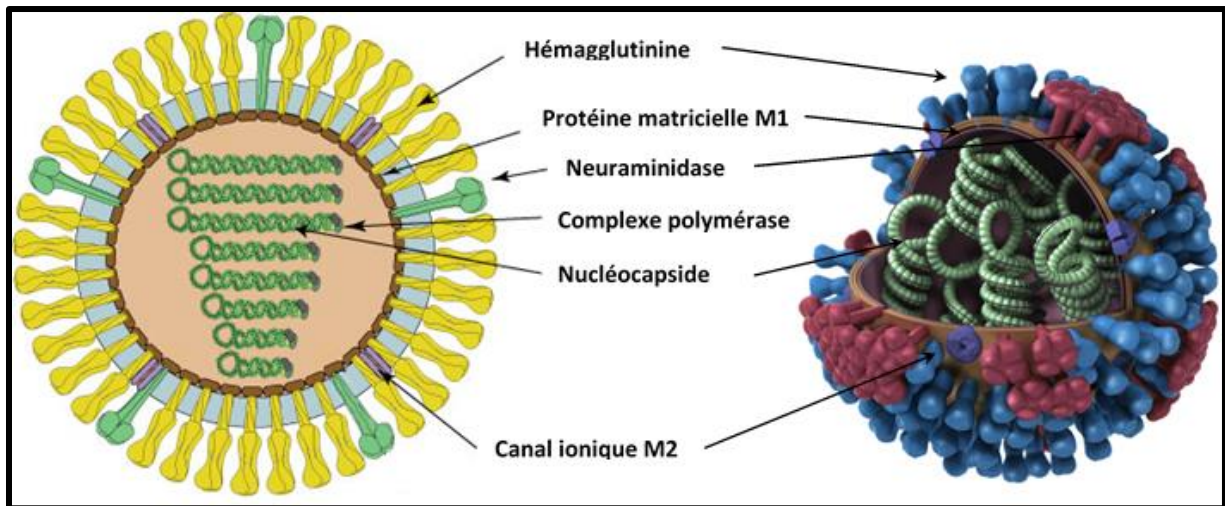


Figure 1 : Structure du virus influenza A. Image tirée de (6).

Au niveau de sa morphologie, le virus influenza est un virus enveloppé qui n'est pas doté d'une capsidie polymérique. Son enveloppe est une bicouche lipidique issue du phénomène de bourgeonnement à la membrane des cellules infectées (voir partie I.5). Contrairement à certains virus dont la morphologie est strictement dictée par la nature polymérique de leur capsidie, la conformation du virus influenza est de ce fait plus variable. Ainsi, les virions issus du bourgeonnement à la membrane cellulaire ont une forme sphérique ou elliptique, avec un diamètre de 80-120 nm. Le virus peut occasionnellement être retrouvé sous forme filamenteuse, allant jusqu'à une longueur de 20 μm (7). La plupart des souches adaptées en laboratoire présentent une forme sphérique, tandis que les souches isolées cliniquement présentent une forme filamenteuse, perdue lors de leur adaptation à l'ovoculture en laboratoire (7). La bicouche lipidique du virus est ponctuée de radeaux lipidiques enrichis en cholestérol, issus du processus de bourgeonnement (3).

Bien que le virus influenza contienne en grande proportion les protéines « virales » détaillées précédemment, il embarque également, lors du bourgeonnement, un grand nombre de protéines cellulaires de la cellule hôte infectée (4). Par ailleurs, il apparaît que lors de la production de nouveaux virions, la majeure partie (>90%) des particules produites sont non-infectieuses (3).

Tableau 1 : Génome et fonctions principales des protéines d'Influenza A (A/Puerto Rico/8/1934). Tiré de (8)

Segment	Longueur ARN viral (bases)	Protéine	Nombre d'acides aminés	Fonctions
1	2341	PB2	759	Sous-unité polymérase, reconnaissance cap ARNm
2	2341	PB1	757	Sous-unité polymérase, activité endonucléase, élongation de l'ARN
		PB1-F2	87-91	Activité pro-apoptique
3	2233	PA	716	Sous-unité polymérase, activité protéase, assemblage du complexe polymérase
4	1778	HA	566	Glycoprotéine de surface, liaison au récepteur, fusion membranaire, Antigène viral majeur
5	1565	NP	498	Nucléoprotéine, activité de liaison à l'ARN requise pour la réplication
6	1413	NA	454	Glycoprotéine de surface, relargage du virus, activité neuraminidase
7	1027	M1	252	Protéine matricielle, régulatrice de l'export nucléaire des ARN, bourgeonnement viral
		M2	97	Canal ionique, libération des nucléoprotéines
8	890	NS1	230	Antagoniste de l'interféron, régulateur du niveau d'expression des gènes de l'hôte
		NEP/NS2	121	Export nucléaire des ARN viraux

I.1.2. Les glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine et la neuraminidase

L'hémagglutinine (HA) est la protéine d'enveloppe majeure du virus influenza. Elle est responsable de l'attachement du virus à la cellule hôte. Cette liaison est réalisée par la liaison de l'hémagglutinine virale aux résidus d'acides sialiques à l'extrémité des glycoprotéines membranaires de la cellule hôte, étape qui va précéder l'internalisation du virus (voir section I). HA se présente sous forme de protéine trimérique, résultante de l'association non covalente de monomères (d'environ 70-75 kDa), ancrée dans la membrane virale (9). Par ailleurs, chaque monomère d'hémagglutinine est constitué de deux sous-unités (HA1 et HA2) reliées entre elles par un pont disulfure, et dérivées du clivage protéolytique de la forme précurseur HA0. Le monomère comprend deux domaines distincts : la tête globulaire de l'hémagglutinine qui inclut le site de liaison au récepteur et cinq sites antigéniques (domaines fortement variables *highly variable domains*), et la queue formée par l'autre partie de HA1 et HA2 (domaine fortement

conservé *well-conserved domain*). La neuraminidase (NA) est une glycoprotéine homotétramérique, formée par l'association non covalente de 4 monomères, d'une taille d'environ 240 kDa (10). Les fonctions des deux glycoprotéines d'enveloppe HA et NA concernent la reconnaissance et l'interaction avec les acides sialiques des glycoprotéines membranaires à la surface des cellules hôtes. HA va ainsi permettre la fixation du virus à la membrane cellulaire par sa liaison aux glycoprotéines. Par la suite, l'internalisation du virus entraîne un changement conformationnel de HA dans l'endosome qui va permettre la fusion membranaire et la libération des ribonucléoprotéines virales virus (voir section I). NA est, elle, impliquée dans le clivage enzymatique des résidus d'acides sialiques lors du bourgeonnement et du relargage de nouveaux virions à la membrane cellulaire. Ainsi, une balance optimale concernant les proportions et les activités des protéines HA et NA est indispensable afin d'obtenir une réplication et transmission efficaces (11).

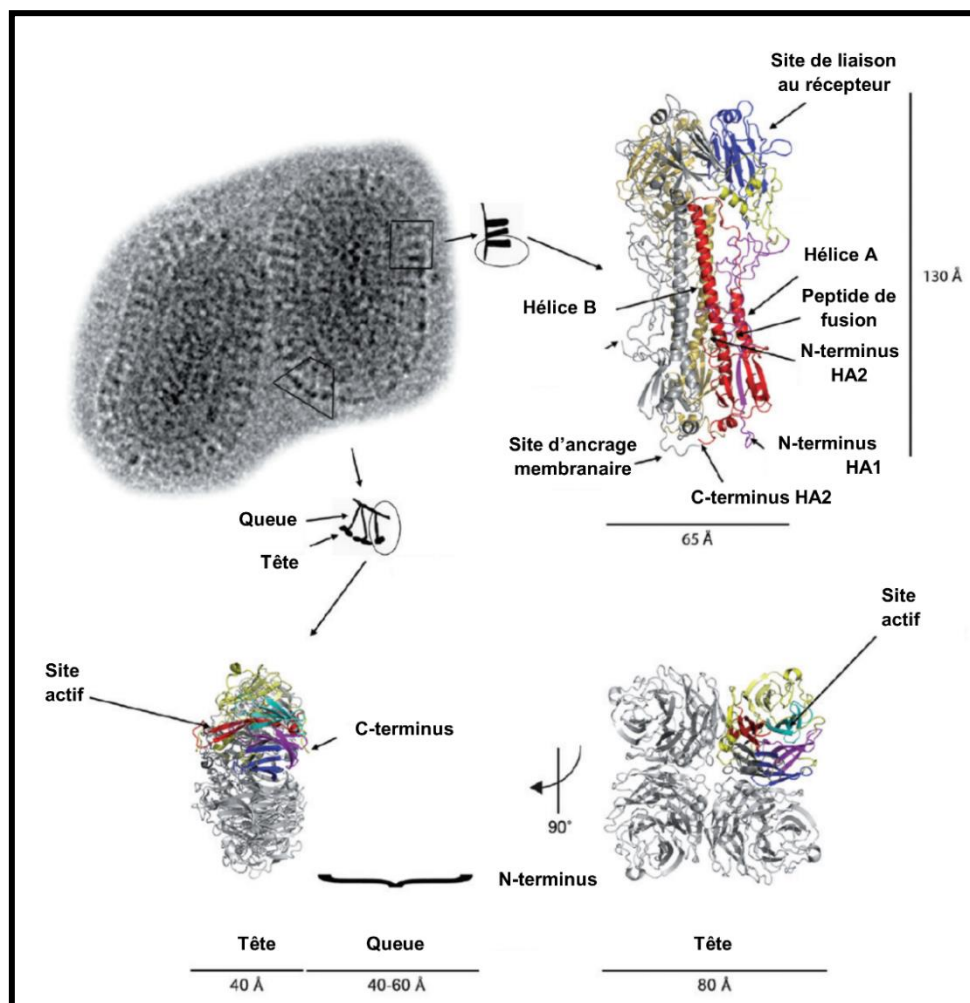


Figure 2 : Structure de l'hémagglutinine (HA, haut à droite) et la neuraminidase (NA, bas) du virus influenza par microscopie électronique (au niveau de la membrane virale, en haut à gauche) et cristallographie aux rayons X. Tiré de (10).

I.2. Classification

Comme dit précédemment, il existe trois types de virus influenza : les virus A, B ou C. Cette classification a été déterminée sur la base de différences structurales entre les protéines virales, le spectre des hôtes touchés et la pathogénicité, l'organisation génomique et la morphologie.

Les virus influenza de **type A** présentent différents sous-types basés sur la nature de leurs antigènes membranaires. Jusqu'à présent, 18 sous-types d'hémagglutinine et 11 sous-types de neuraminidase ont été décrits (12). Ces sous-types sont distinguables sérologiquement, c'est-à-dire qu'il y a une spécificité de la réponse humorale pour chaque sous-type. Tous ces sous-types ont été retrouvés chez les espèces d'oiseaux aquatiques, à l'exception des souches H17N10 et H18N11, récemment découvertes chez des chauves-souris, mais ne présentant pas l'activité d'hémagglutination et l'activité enzymatique de la neuraminidase caractéristiques des autres souches (12,13).

Les virus influenza de **type B** sont très majoritairement retrouvés chez l'humain (nb : des isolations de virus influenza B ont été réalisées chez le phoque (14)). Ce type évolue moins rapidement que le virus influenza A (fréquence de mutations 2 à 3 fois plus élevée pour la plupart des gènes de type A par rapport à ceux du type B (15)). Ajouté à sa quasi-spécificité pour l'homme, la dérive antigénique restreinte des virus de type B explique qu'il n'ait pas été à l'origine de pandémie à l'heure actuelle. Le type B reste cependant à l'origine d'épidémies locales d'apparition plus tardives durant la saison hivernale, voir peut même être prévalent sur le type A durant certaines saisons (16), avec cependant des manifestations cliniques généralement moins sévères que pour celles observées pour le type A (8).

Contrairement aux types A et B, les virus influenza de **type C** contiennent 7 segments de gènes et une seule glycoprotéine de surface, assurant des fonctions d'hémagglutinine et d'estérase (contre 3 : HA, NA et M2 pour les deux autres types) (17). De même que pour le type B, les virus C sont adaptés à – et ont été isolés – presque exclusivement chez l'humain (des isolations ont été réalisées chez le porc et le chien(18)). Ce type est endémique et occasionne sporadiquement des pathologies respiratoires de sévérité moyenne.

I.3. Clinique et intérêt en matière de santé publique

I.3.1. La clinique de l'infection virale par *Influenza*

Les virus influenza se propagent par voie aérienne, via l'inhalation de gouttelettes infectieuses pulvérisées sous forme d'aérosol par les éternuements ou la toux, ou par contact direct avec des surfaces contaminées par ces gouttelettes infectieuses (19). Du fait de sa nature de virus enveloppé, il est relativement instable dans l'environnement et peut être inactivé par différents moyens (chaleur, sécheresse, pH acide ou basique, détergents, inactivation protéique par oxydation ou réduction à l'aide de différentes substances tels que l'ozone, le formaldéhyde ou la beta-propiolactone).

Cette infection virale peut entraîner des hospitalisations et des décès, notamment parmi les groupes à haut risque. La durée d'incubation est de 1 à 3 jours, avec une contagiosité un jour avant le début des symptômes et jusqu'à 6 jours après. Les symptômes communément relevés sont : fièvre élevée, frissons, céphalées, myalgies, associés à un syndrome fonctionnel respiratoire et un syndrome algique diffus (17,20). La cause sous-jacente de ce syndrome fonctionnel respiratoire (bronchite, pneumonie...) est une perte de fonction des tissus respiratoires due à une forte lyse cellulaire et déstructuration des épithéliums (3). Une surinfection bactérienne, facilitée par les lésions épithéliales, peut survenir dans un second temps, avec des complications respiratoires (otite moyenne aiguë, sinusite aiguë, pneumonie aiguë). Des complications extra-respiratoires peuvent également apparaître (myocardite, péricardite, encéphalite...).

I.3.2. Epidémiologie du virus *Influenza*

Depuis 1700, le virus influenza A semble avoir occasionné une douzaine de pandémies (17). Trois pandémies de grippe ont été recensées au cours du siècle dernier. La grippe espagnole de 1918 (30-50 millions de morts (17,21)) fut causée par l'émergence d'une souche virulente d'H1N1, la grippe asiatique H2N2 de 1957 (1-4 millions de morts) et la grippe de Hong-Kong à virus H3N2 de 1968 (1-2 millions de morts). La première pandémie recensée au 21^e siècle date de 2009 et l'émergence de la souche H1N1 à Mexico. Il arrive que les virus influenza d'origine aviaire franchissent la barrière d'espèce et puissent infecter les humains. Dès lors, si la souche de cette zoonose possède ou acquiert la capacité de transmission inter-humaine, l'absence d'immunité préexistante dans la population humaine rend cette souche hautement

susceptible d'entraîner une pandémie (12). Cette menace est d'autant plus sérieuse qu'il est apparu ces dernières années, particulièrement en Asie, des souches aviaires hautement pathogènes à l'origine de zoonoses importantes (HPAI : *Highly Pathogenic Avian Influenza* : apparues pour la première fois à Hong Kong en 1997, et réapparues en 2003, elles entraînent une mortalité chez les volailles pouvant atteindre 100% en 48h) (13,22). C'est notamment le cas de souches H5N1 et H7N9 hautement pathogènes ayant entraîné des épidémies de grippe aviaire à l'échelle mondiale avec des millions de volailles tuées, et, notamment, un accroissement du nombre de cas de transmissions inter-humaine recensées (22). Jusqu'à présent, les souches HPAI H5N1 ont entraîné près de 900 cas reportés chez l'homme, avec un taux de mortalité correspondant de 53% (données OMS (23)). Le pouvoir infectieux de ces souches envers les humains est faible, ce qui oblige à un contact rapproché avec un animal porteur pour induire une infection nécessitant une multiplicité d'infection plus élevée que pour les souches humaines (3). Cette incidence pourrait être accrue avec la génération d'une souche humaine à partir d'une souche H5N1 HPAI, d'autant plus probable qu'il a été reporté que cette apparition nécessiterait seulement 4 mutations sur une souche étudiée (22). L'homme n'est cependant pas dénué d'immunité vis-à-vis de H5N1 du fait du caractère antigénique proche de la neuraminidase N1 de ce dernier avec celle des souches H1N1 circulantes, mais il reste que de nombreuses autres souches responsables de zoonoses, particulièrement en Asie, sont également préoccupantes (H5N6, H6N1, H7N9 et H10N8 ont entraîné des cas mortels chez l'humain) (13). La multiplication des souches circulantes à potentiel pandémique et l'intensification des contacts entre les réservoirs humain et animal avec l'accroissement de la population rendent urgente la mise au point de procédés de production réactifs pour la préparation de vaccins pandémiques.

I.4. Les mécanismes évolutifs du virus *Influenza*

Le virus influenza entraîne chez l'humain des épidémies saisonnières (sous-types A et B), et peut être occasionnellement à l'origine de pandémies (sous type A) (17). Cette épidémiologie est liée aux mécanismes d'évolution du virus influenza guidé par l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Deux mécanismes sont illustrés dans la **Figure 3** et décrits ci-après.

Les épidémies saisonnières occasionnées par le virus sont dues au phénomène de **dérive** ou **glissement antigénique**. Cette dérive correspond à des modifications

mineures du génome viral entraînant des substitutions d'acides aminés au niveau des sites antigéniques des glycoprotéines membranaires virales (24). Ce phénomène permet l'échappement du virus à l'immunité acquise et la justification de la vaccination annuelle antigrippale. L'ARN polymérase virale est sujette à un grand nombre d'erreurs de réplication, et ne comporte pas de mécanisme de correction (13). La fréquence des mutations ponctuelles du génome est donc élevée. La pression de sélection immunologique des populations hôtes favorise l'apparition de souches non neutralisées par les anticorps spécifiques de la souche circulante initiale ; ce qui est dû à une accumulation de mutations qui modifient l'immunogénicité des antigènes membranaires (13,25). La tête globulaire de l'hémagglutinine est la région la plus touchée par ces changements (au niveau des domaines fortement variables de HA1), en lien avec sa plasticité et son importance dans la réponse immunitaire (13).

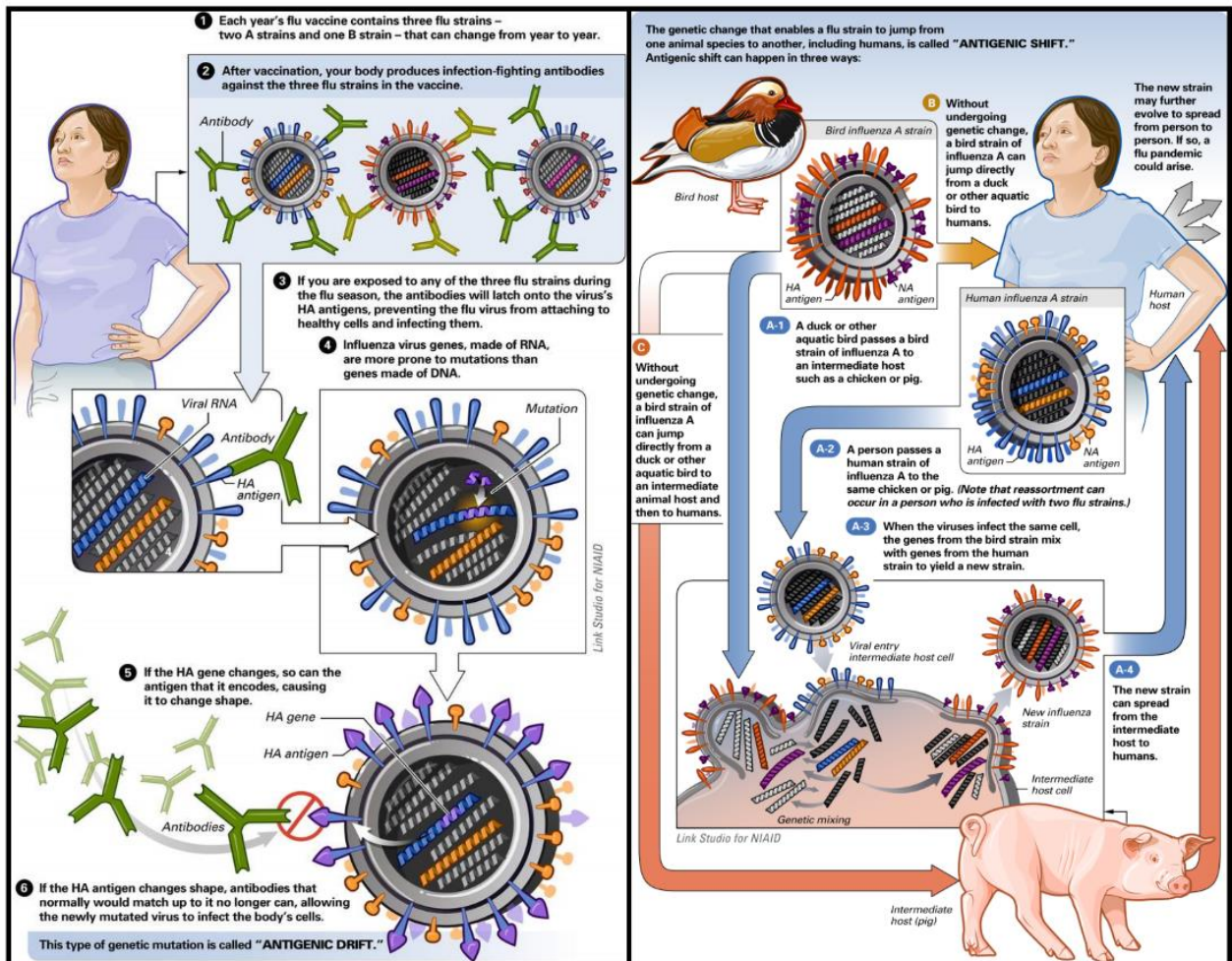


Figure 3 : Phénomènes de glissement (shift) et cassure (drift) antigénique du virus Influenza (Source : National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)). ① Le vaccin contient deux souches A et une B, renouvelées annuellement ②. Après la vaccination, le corps produit des anticorps dirigés contre les antigènes des trois souches ③. Suite à l'exposition ultérieure à l'une des souches, les anticorps vont neutraliser le virus circulant par fixation à la HA ④. Le génome d'influenza, constitué d'ARN, est plus sujet à mutation que pour des virus à ADN ⑤. Les mutations génétiques entraînent des changements conformationnels de HA ⑥ qui induisent un défaut de reconnaissance par les anticorps, ce qui permet au virus muté de poursuivre l'infection. Droite :

La cassure antigénique peut se produire de trois manières : A/ un oiseau aquatique transmet une souche aviaire à un hôte intermédiaire (poulet/cochon), de même qu'un humain lui transmet une souche humaine. Lorsque les deux souches infectent la même cellule hôte, un réassortiment génétique se produit. La nouvelle souche peut se propager de l'hôte intermédiaire à l'humain. Sans changement génétique, une souche aviaire peut également infecter directement un humain (B) ou un hôte intermédiaire avant transmission à l'humain (C). La nouvelle souche générée peut également évoluer et entraîner une pandémie si la transmission interhumaine est facilitée.

La nature segmentée du génome viral permet également de générer des souches réassortantes lors d'une infection, de telle sorte que le nouveau virus possède une nouvelle composition de segments (22). Ce phénomène est nommé **saut** ou **cassure antigénique**. Différents mécanismes peuvent entrer en jeu : un réassortiment génétique du génome viral entre deux souches chez un hôte co-infecté (co-infection de virus humain et aviaire chez le porc, mis en cause pour les pandémies de 57 et 68) ou une adaptation multigénique à partir du réservoir aviaire (comme ce fut le cas pour la grippe espagnole de 1918). Cette cassure aboutit à l'émergence d'un nouveau sous-type avec une hémagglutinine – ou une combinaison d'hémagglutinine et de neuraminidase – éloignée(s) des souches circulantes de telle sorte que la population ne possède aucune immunité préexistante face à ce nouveau virus (24).

II. La vaccination antigrippale

II.1. Histoire de la vaccination

La vaccination est une méthode de prévention primaire en cela qu'elle agit en amont de la maladie. Ce procédé consiste en l'introduction d'agent(s) extérieur(s) dans un organisme afin d'initier une réaction immunitaire positive contre une maladie infectieuse.

Le principe de la vaccination moderne a été introduit par les travaux de Jenner (1749-1823). Ce médecin de campagne anglais énonce le principe de l'atténuation des germes par passage d'une espèce animale à une autre. Il prouve en 1796 que l'introduction de pus de la vaccine (variole bovine) dans le corps humain par scarification protège du virus de la variole. La vaccine (*cow-pox*) étant transmissible à l'homme mais ne provoquait que des lésions bénignes. Jenner s'est basé sur une croyance paysanne selon laquelle les personnes ayant contracté la vaccine, par manipulation des pis de vaches infectées, ne contractaient pas par la suite la variole. La variolisation, devenue vaccination, connu un succès en Europe et permis l'extinction du virus de la variole en 1980 (26).



Figure 4 : Gauche : Pasteur examinant une moelle de lapin rabique (Albert Edelfelt (1854-1905) Louis Pasteur, Huile sur toile, 1885) ; Droite : Flacon avec moelle épinière de lapin rabique suspendue au-dessus de morceaux de potasse.

Par la suite, Pasteur (1822-1895) est à l'origine du terme vaccin (27). En 1881, il définit le vaccin comme l'utilisation de : « virus affaiblis ayant le caractère, propre au vaccin jennérien, de ne jamais tuer, de donner une maladie bénigne qui protège de la maladie mortelle » (28). Après avoir mis au point sa méthode d'atténuation de la virulence sur plusieurs pathogènes (choléra des poules – 1878, charbon des moutons – 1881, rouget du porc) par exposition au contact de l'oxygène de l'air, Pasteur applique sa méthode au virus de la rage (29). Après obtention d'une virulence stable par inoculation du virus de lapin à lapin, il suspend des moelles de lapin rabiques dans des flacons afin d'obtenir l'oxydation du virus par l'air et son atténuation (voir **Figure 4**). La réinjection de ces moelles à des chiens enragés évite la déclaration du virus. L'inoculation de son vaccin à un jeune garçon mordu par des chiens enragés en 1885 (13 moelles rabiques de moins en moins atténuées en dix jours) fera de ce dernier le premier humain vacciné (29).

La première isolation du virus influenza en 1933 suite à la propagation par infection de furets lança rapidement la recherche d'un vaccin antigrippal (16). La première vaccination est reportée en 1936 avec l'injection de virus influenza ayant subi 30 passages en œufs. Ce procédé sera par la suite utilisé en URSS pendant plus de 50 ans pour vacciner plus d'un milliard de personnes (16).

II.2. La production de vaccins influenza

II.2.1. Evolution de la composition vaccinale

Du fait de la dérive antigénique du virus influenza liée aux phénomènes de glissement et de cassure antigénique, les souches du virus influenza échappent à l'immunité spécifique acquise préalablement par infection naturelle ou vaccination préalable (notamment par un manque d'immunité croisée des anticorps neutralisants développés lors d'une immunisation préalable) (30). C'est pourquoi le calendrier vaccinal recommande un renouvellement annuel de la vaccination antigrippale chez les personnes à risque (65 ans et plus, femmes enceintes, patients immunodéprimés...) et les professionnels de santé en contact avec ces patients (31).

Comme le détaille la **Figure 5**, l'apparition et l'isolation subséquente de nouvelles souches virales ont rendu nécessaire une évolution du vaccin. Suite à l'isolation d'une souche à caractère antigénique différent de la souche A/PR8 en 1940, nommée influenza B, le vaccin produit en 1942 se dut d'être composé de deux souches (A/PR8 et B/Lee) (16). Depuis 1973, l'OMS émet des recommandations annuelles au sujet de la composition des futurs vaccins sur la base des données épidémiologiques et la caractérisation des souches circulantes (16,32). A l'heure actuelle, les vaccins produits sont en majorité dits trivalents (*trivalent inactivated vaccine : TIV*), car ils sont formulés à partir de trois souches de référence sélectionnées par l'OMS (deux souches A et une souche B). Des vaccins quadrivalents (*QIV*) commencent à faire leur apparition sur le marché, avec ajout d'une souche B supplémentaire à la formulation pour faire face à la co-circulation de souches B et combler le manque d'efficacité du vaccin actuel (16,30).

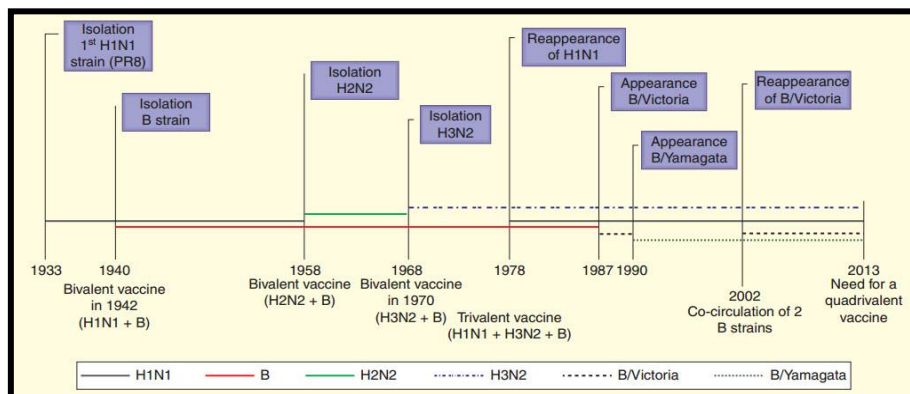


Figure 5 : Evolution du vaccin en fonction de l'évolution des souches circulantes depuis 1933. Tiré de (16)

II.2.2. Les différents types de vaccins influenza

Comme dit précédemment, les premiers vaccins antigrippaux développés étaient des vaccins vivants atténués, développés en 1936 par Smorodintseff (16). Ces vaccins atténués sont habituellement issus de souches sensibles à la température et adaptées au froid, qui vont pouvoir se répliquer au niveau du tractus respiratoire supérieur, mais non au niveau inférieur (13). Cependant, malgré la maîtrise du procédé d'obtention de souches moins virulentes après plusieurs passages en œuf, cette virulence peut être de nouveau gagnée par les souches virales. La nature des vaccins vivants atténués les rend plus complexes à utiliser pour de nombreuses raisons en dehors du problème d'instabilité de l'atténuation : le risque de recombinaison avec des souches sauvages, la prévention de l'infection par la souche vaccinale atténuée dans le cas d'une immunité pré-existante et l'instabilité des préparations de virus vivants (16). C'est pour ces raisons que le vaccin vivant atténué (ex : Flumist® aux USA, Fluenz® en France) est aujourd'hui autorisé dans certains pays et limité à certains cas spécifiques (jeune enfant immunocompétent).

Comme l'indique la **Figure 6**, il existe différents types de vaccins influenza inactivés, distinguables entre eux selon l'organisation structurale des antigènes vaccinaux et le nombre de constituants contenus dans le vaccin vis-à-vis du virus influenza natif (30).

Les premiers vaccins basés sur la production de virus entier inactivé (*whole inactivated virus*) ont été licenciés en 1945 aux Etats-Unis, et très largement utilisés (33). Ce vaccin correspond à du virus purifié puis inactivé chimiquement par adjonction de formaldéhyde (formaline®) ou β -propiolactone. Ces composés réagissent avec des groupements nucléophiles (comme des amines primaires/secondaires) des acides nucléiques et protéines virales, altérant la capacité de fusion membranaire et de réplication virale (34).

Cependant, les vaccins à virus entier inactivé possèdent certaines limitations. En effet, la réponse immunitaire engendrée offre une séroprotection relativement courte avec une faible capacité d'induction d'une immunité cellulaire et une réactogénicité élevée (du fait de la présence d'impuretés comme les protéines d'œuf présentes en quantité relativement élevée avant optimisation des procédés) (30,33,35). Dès lors, les vaccins à virus entier inactivé ont été délaissés au profit des vaccins fragmentés lorsque ces derniers ont été développés. Les vaccins fragmentés (*split vaccine*) sont issus de la

rupture et fragmentation des particules virales par l'adjonction d'éther diéthylique ou de détergent (30). De ce fait, l'organisation structurale des antigènes viraux est partiellement perdue, de même qu'une grande partie de l'ARN viral. Les vaccins fragmentés sont aujourd'hui très largement utilisés pour la formulation du vaccin trivalent.

D'autres types de vaccin inactivés ont été développés plus récemment. Le vaccin sous-unitaire correspond aux antigènes vaccinaux (HA, NA) sous une forme libre. Deux stratégies très différentes permettent sa production : soit par purification après fragmentation du virus, soit par production de protéines recombinantes (antigènes) par culture cellulaire.

Une variante supplémentaire des vaccins fragmentés et sous-unitaires consiste en la réalisation de virosomes. Ces vaccins sont issus de la reconstitution de la conformation des protéines virales membranaires par ajout de phospholipides après fragmentation et purification (30,36). Ils possèdent donc une structure très proche des particules pseudo-virales (ou *VLPs*), n'incluant pas de matériel génétique viral, et leur sont parfois assimilés. La production de ces deux produits biologiques est cependant différente, car les *VLPs* sont directement issus d'un bourgeonnement des protéines virales au niveau membranaire et ne sont pas reconstitués.

Les types de vaccins détaillés précédemment font tous appel (hormis la production d'hémagglutinine recombinante) à la production d'antigènes vaccinaux en exploitant le mécanisme naturel d'infection et réplication du virus influenza. Ces procédés « classiques » sont éprouvés et sont à l'heure actuelle utilisés pour la quasi-totalité de la production vaccinale. Cependant, du fait du développement de la biologie moléculaire et de l'avancée des connaissances sur les mécanismes de l'immunité dirigée contre influenza, un éventail de nouvelles stratégies vaccinales est en cours de développement (abordé ci-après : partie II.I.1).

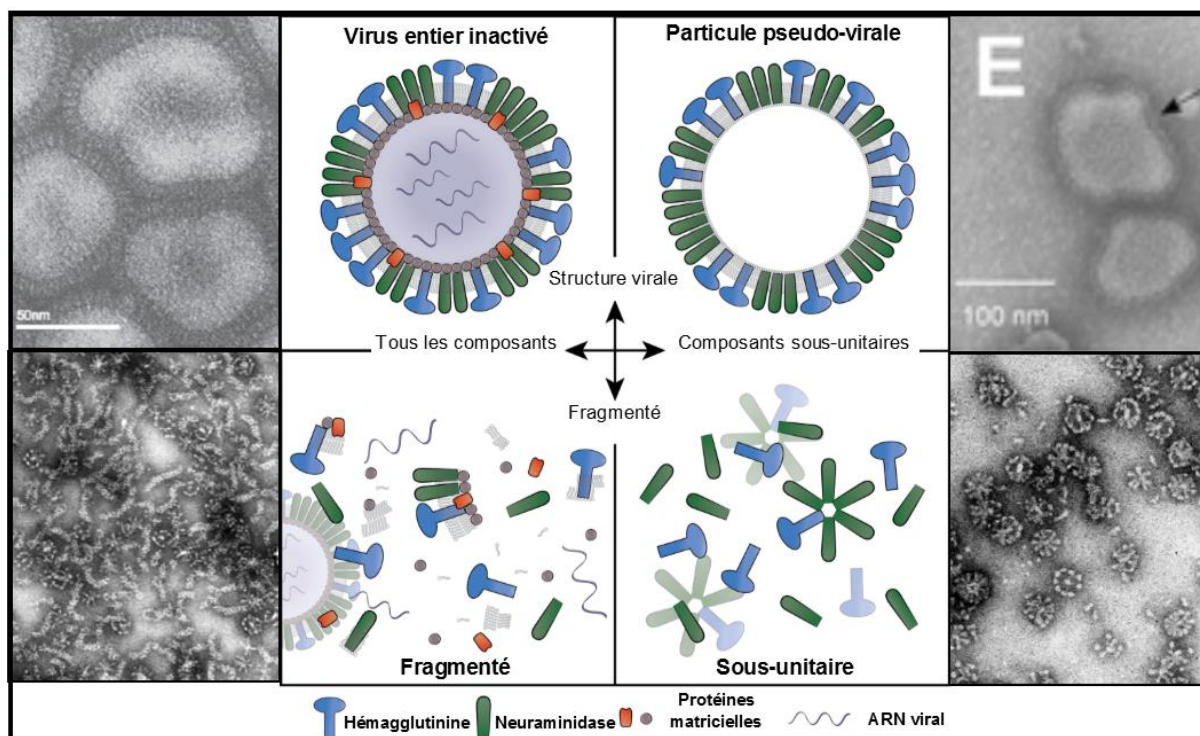


Figure 6 : Composition des différents types de vaccins influenza. A partir de (30)

II.2.3. Le procédé d'ovoculture

II.2.3.a. Historique

Ce procédé a été mis en place dès les années 1940, au commencement par les Etats-Unis et la Grande-Bretagne pour un usage militaire, et reste encore aujourd'hui le procédé qui supporte une très grande majorité de la production vaccinale. Pour la production de vaccins inactivés, non répliatifs, la quantité d'antigènes vaccinaux requise pour l'obtention d'une réponse immunitaire protectrice est plus importante que pour les vaccins vivants atténués. C'est pour cette raison que le procédé s'est basé sur la technique de culture en œuf embryonné (développé par Burnet en 1937 (26)) permettant d'obtenir des concentrations suffisantes de virus dans la cavité allantoïque d'œuf de poule. La souche A/PR8/1934, isolée de Puerto Rico en 1934, a un fort potentiel de répliation en œuf. Cette dernière a donc été mise à profit pour obtenir des grandes quantités d'antigène. Elle a au préalable subit un procédé d'adaptation long (77 passages en souris, 717 en culture cellulaire, 30 en embryons de poule, 5 en furet, de nouveau 50 en embryons de poule) (9).

II.2.3.b. Stratégie de production

Le procédé œuf est aujourd'hui encore à l'origine de la majorité (>90%) de la production vaccinale annuelle, estimée à 620 millions de doses pour la saison 2011 (37).

Certains facteurs conditionnent l'emploi du temps de la production. Les producteurs doivent prévoir deux cycles de production annuels, pour les deux hémisphères. Egalement, la libération des lots doit concorder avec les programmes de vaccination annuels conduits les mois précédents la circulation des souches virales (32). Ces deux conditions laissent une période relativement courte d'environ 6 mois aux industriels pour produire, quantifier et formuler les lots de vaccins. Comme le montre la Figure 10, plusieurs étapes peuvent être limitantes au sein du procédé.

Un réseau international de surveillance, coordonné par l'OMS, s'est développé afin de surveiller l'émergence et l'épidémiologie des souches d'*Influenzae*. Les pays possèdent des centres nationaux de référence en leur sein, chargés de la surveillance épidémiologique du virus (ex : CNR Virus Influenzae - Région Sud à Lyon). Ces derniers sont chargés du typage des prélèvements cliniques et font véhiculer l'information aux cinq centres de référence mondiaux reconnus par l'OMS (CDC – USA, NIMR – Royaume-Uni, VIDRL – Australie, NIID – Japon, CDC – Chine). Ces derniers réalisent des analyses antigéniques et génétiques afin de caractériser les souches (38,39). L'OMS, de manière bisannuelle (réunion en février pour l'hémisphère Nord, en septembre pour l'hémisphère Sud), se base sur la revue des données épidémiologiques pour cartographier les nouvelles souches circulantes et émettre des recommandations sur les souches à inclure dans le prochain vaccin saisonnier (32,38).

Après la sélection des souches références par l'OMS, la première étape du procédé est la préparation de **souches réassortantes hautement répliquatives** (*high growth reassortants*). Cette étape permet l'obtention de virus possédant à la fois les antigènes membranaires (HA et NA) des souches de références et les protéines internes de souches « de production » standardisées (souches A/PR8 ou apparentées avec un potentiel de répliquaison en œuf élevé) (32). En effet, l'un des facteurs les plus importants pour la productivité du procédé est le rendement de production de la souche vaccinale (qui détermine le nombre d'œufs nécessaires par souche vaccinale et conditionne les coûts de production par dose). Deux techniques peuvent être utilisées.

La technique classique, développée depuis le début des années 1970, est la co-infection des deux souches en œuf et la sélection de recombinants par de multiples passages en présence de sérum dirigé contre les antigènes membranaires de la souche PR8. Après un certain nombre de passages, le génome des réassortants à fort potentiel de réplication est analysé (par RT-PCR/RFLP) pour valider l'obtention de la souche d'intérêt (35). Une technique plus récente fait appel à la génétique inverse, impliquant 6 plasmides codants pour les protéines internes du virus A/PR8 et deux plasmides codants pour la HA et NA de la souche référence. Une transfection de co-culture cellulaire par ces plasmides permet l'expression de souches réassortantes et la sélection de la souche d'intérêt de manière rapide et reproductible (40).

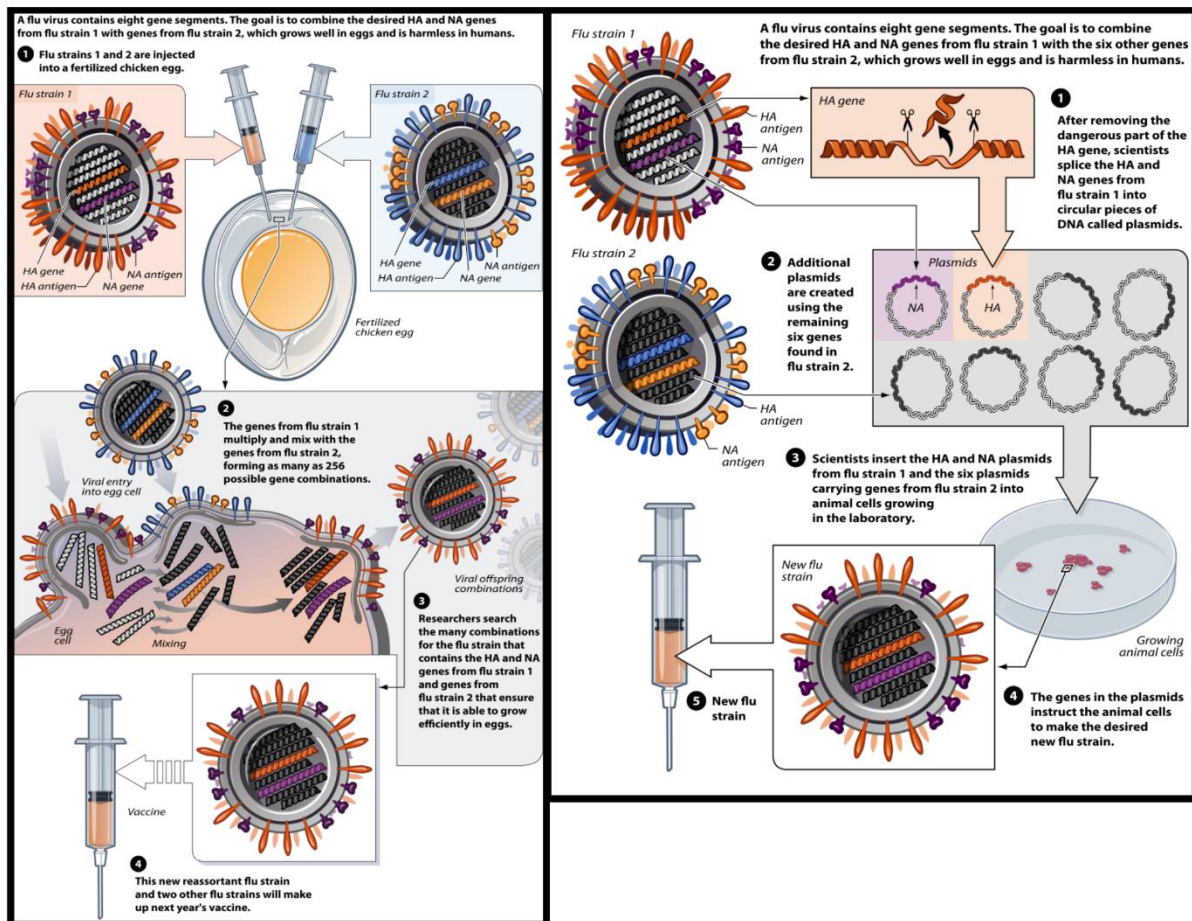


Figure 7 : Procédés de préparation d'une souche vaccinale réassortante. Le but consiste à combiner les gènes de HA et NA de la souche d'intérêt avec les gènes d'une souche qui se réplique facilement en œuf. **Gauche :** technique de co-infection : ① les souches 1 et 2 sont injectées dans un œuf embryonné ; ② les gènes des deux souches sont répliqués et se mélangent, avec $2^8 = 256$ combinaisons possibles ; ③ les combinaisons contenant la HA et NA d'intérêt et se répliquant bien en œuf sont sélectionnées ; ④ la nouvelle souche réassortante entrera dans la composition du vaccin annuel. **Droite :** Technique de génétique inverse : ① délétion de la séquence codant pour le site de clivage polybasique de HA et insertion des gènes codants pour les protéines virales dans des plasmides pour la HA et NA d'intérêt ; ② de même que pour les autres gènes de la souche 2 ; ③ transfection d'une co-culture cellulaire avec les 8 plasmides et obtention du virus réassortant ④ (Source : National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)).

Cette étape permet de surpasser la variabilité d'infectivité des différentes souches pour l'œuf causant des taux de production d'antigènes faibles (pouvoir infectieux faible de certaines souches, ou au contraire, élevés pour les souches H5N1 hautement pathogènes, responsable de la mort précoce des œufs embryonnés) (13). Également, les souches H5N1 hautement pathogènes nécessitent une manipulation dans des laboratoires de niveau P3. La délétion de la séquence nucléotidique codant pour le site de clivage polybasique de l'hémagglutinine virale, déterminant majeur de la pathogénicité, permet d'obtenir par génétique inverse un réassortant non virulent (cf étape ① de la **Figure 7**) (13).

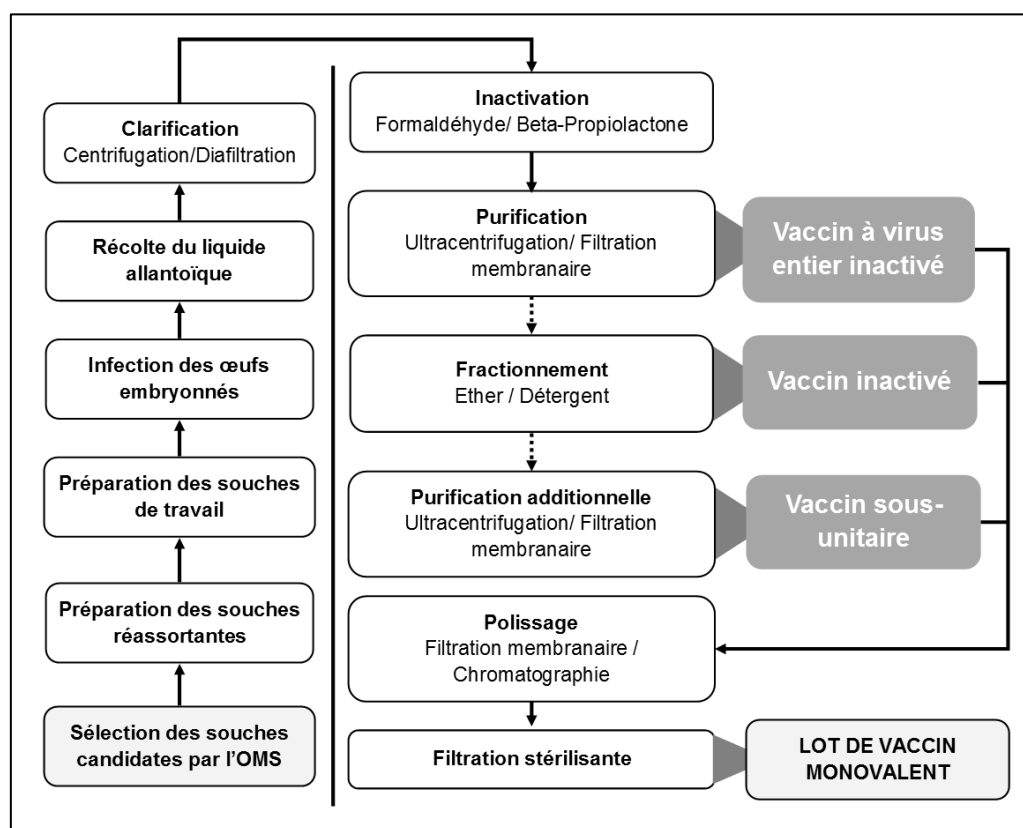


Figure 8 : Procédés de production et de purification de lots de vaccin *Influenzae* monovalents. A partir de (39)

L'étape la plus déterminante du calendrier de production du vaccin antigrippal n'est pas attenante à la production en elle-même, mais relève de la quantification des lots produits (voir **Figure 10**), indispensable à la formulation vaccinale. La technique de référence approuvée par l'OMS pour la quantification des lots à l'heure actuelle est l'immunodiffusion radiale (*Single Radial Immunodiffusion* : SRID) (41,42), développée à la fin des années 70. Elle fut établie comme technique de référence en 79 suite à des essais cliniques démontrant une corrélation entre les titres obtenus et l'immunogénicité vaccinale (39,43). Elle est basée sur l'immuno-précipitation de

l'hémagglutinine virale au contact d'un sérum de référence. Elle nécessite donc la mise au point de réactifs calibrés (sérum et antigènes de référence) pour chaque nouvelle souche, et leur production à échelle suffisante pour subvenir aux besoins des producteurs concernant les souches de référence. Les réactifs sont réalisés et validés par les centres de références de l'OMS et disponibles environ 3-4 mois après la sélection des souches référence par l'OMS (32,38).

Après sélection des souches pour chaque culture « monovalente » (souche H1N1, H3N2 et B pour le vaccin trivalent conventionnel) et production de souches réassortantes hautement répliquatives pour chacune d'elles, la production des lots monovalents peut se dérouler suivant le procédé d'ovoculture (44). En dépit du grand nombre de vaccins sur le marché, les différentes étapes du procédé de production sont relativement semblables entre les différents producteurs. Ces étapes sont détaillées ci-dessous.

1. Préparation des souches de travail

Les laboratoires de référence de l'OMS fournissent aux fabricants les souches sauvages ou réassortantes pour les souches de références. Chaque fabricant prépare par la suite des lots de semences par passage multiple en œufs exempts de pathogènes ou en culture de cellules primaires obtenues à partir de ces mêmes œufs (39). Ce procédé encourage à la fois la sélection de virus fortement répliquatif et la dilution d'agents contaminants éventuels, en limitant cependant le nombre de passages afin de conserver les caractéristiques antigéniques de la souche de référence. Ces lots de semence sont testés pour leur stérilité concernant d'autres agents pathogènes avant de servir à l'inoculation des œufs du procédé de production.

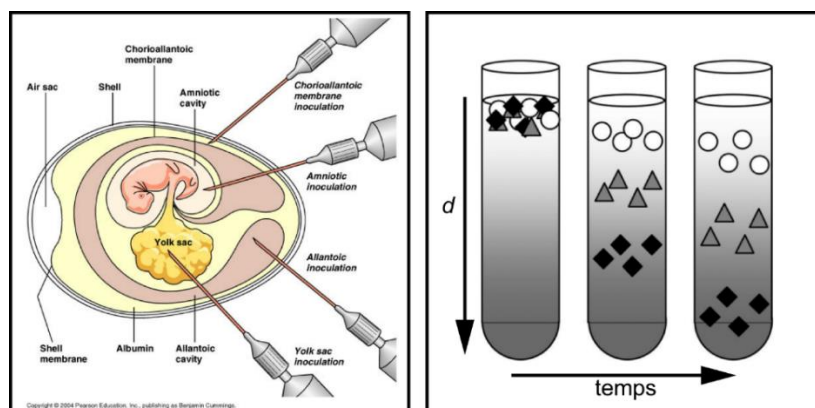


Figure 9 : Gauche : Techniques d'inoculation virale d'œuf embryonné. La technique varie suivant le virus cultivé. Droite : Principe de séparation par ultracentrifugation zonale. Tiré de (45).

2. Inoculation des œufs embryonnés et récolte

Le procédé de culture et propagation de virus en œufs embryonnés est très répandu pour l'isolation et la culture virale. Les lots de semences vaccinales sont inoculés dans la cavité allantoïque d'œufs à 10-11 jours d'embryogenèse (voir **Figure 9**). Afin de satisfaire les exigences des agences réglementaires (FDA, EMA), ces œufs sans pathogènes sont spécialement produits pour la production vaccinale. Puis les œufs sont incubés en couveuse à 33-35°C pendant 3 jours avant récolte. A cette étape, l'œuf est miré (inspection visuelle) pour vérifier l'absence de contamination éventuelle, puis placé à 4°C (ce qui va tuer l'embryon et faciliter la récolte du fait de la vasoconstriction) (39). Le liquide allantoïque est par la suite récolté avant une étape de clarification. Cette étape est réalisée soit par centrifugation (13000 xg), soit par filtration membranaire et permet d'éliminer les débris cellulaires et autres contaminants présents dans le liquide allantoïque (46).

3. Purification/ Inactivation et fractionnement

A la suite de la clarification, le liquide allantoïque va être traité par ultracentrifugation zonale (voir **Figure 9**). Une étape d'inactivation virale par traitement chimique (addition de formaldéhyde ou bêta-propiolactone) va être réalisée en amont ou en aval de cette séparation, suivant les procédés (39). L'ultracentrifugation zonale permet de séparer le virus des différents contaminants présents dans le liquide allantoïque sur la base d'une différence de densité (par centrifugation en gradient de saccharose), et permet notamment d'éliminer env. 90% des protéines d'œuf présentes dans le liquide allantoïque (46).

Par la suite, un fractionnement des particules virales va être réalisé par ajout d'éther diéthylique ou de détergent (par exemple : TRITON X100, cholate ou désoxycholate, dodécylsulfate de sodium) (30). Ce procédé de fractionnement a été introduit dans les années 60-70 et peut être adapté par les différents producteurs pour chaque souche virale (optimisation de la quantité de détergent ajouté suivant les titres SRID obtenus).

La lyse membranaire sépare les antigènes membranaires (notamment l'hémagglutinine virale qui va reformer des multimères appelés rosettes, voir **Figure 6**) des autres composantes virales (lipides membranaires, ribonucléoprotéines virales et autres protéines). Les producteurs ajoutent parfois des étapes additionnelles de purification (par filtration ou ultracentrifugation) et d'inactivation (46). Ces purifications

supplémentaires permettent d'obtenir du vaccin sous-unitaire (contenant majoritairement HA et NA, voir schéma en bas à droite sur la **Figure 6**).

4. Purification finale et formulation

Après obtention du lot d'antigènes issus de virus fragmenté, une purification finale permet de séparer notamment les contaminants issus du procédé. Ainsi, le saccharose peut être séparé par filtration membranaire, l'éther par élimination de la phase organique et évaporation et les détergents par chromatographie d'absorption. Une étape de filtration stérilisante est présente en fin de procédé (46). Ces étapes de purification finale des lots de vaccin monovalent permettent notamment de répondre aux exigences des agences réglementaires, détaillées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Critères d'évaluation des lots de vaccin monovalents. Les références des méthodes à appliquer selon la Pharmacopée Européenne pour la caractérisation des lots vaccinaux sont indiquées. * La SRID est la seule technique reconnue par l'OMS pour la caractérisation des lots vaccinaux en termes de quantité de HA. A partir de (46).

Paramètres	Cible	Spécifications	Méthode
Antigènes	HA NA	<ul style="list-style-type: none"> 15µg HA/souche/0,5 mL 	SRID* [EP 2.7.1], Test HA, Dot-Blot
	HA NA	<ul style="list-style-type: none"> Présence/activité antigénique 	SRID* [EP 2.7.1], SDS-PAGE, Western Blot/test HA, Dosage enzymatique d'activité NA
Protéines totales	Protéines virales et cellulaires	<ul style="list-style-type: none"> < 40 µg protéine autre que HA/souche/0,5 mL 	Dosage de protéine colorimétrique (Bradford, BCA)
Ovalbumine	Ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> < 2 µg/100 µg HA 	Dosage ELISA [EP 2.7.1]
Quantité d'acides nucléiques	ADN viral et cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> <10 [ng/dose] Fragments <200 paires de base 	Dosage spectrophotométrique, Electrophorèse
Quantité d'endotoxines	Endotoxines	<ul style="list-style-type: none"> < 25-100 [IU/dose] 	Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) assay [EP 2.6.14]
Composés chimiques résiduels	B-propiolactone, Formaldehyde Triton-X100	<ul style="list-style-type: none"> <10 ppm < 0.2 g/L < 100 µg/100 µg HA 	RMN, Dosage colorimétrique [EP 2.4.18], Chromatographie
pH	pH	<ul style="list-style-type: none"> 6.9-7.7 	Potentiométrie [EP 2.2.3]
Stérilité	Contaminants viraux/bactériens	<ul style="list-style-type: none"> Absence d'agents infectieux 	Test de stérilité [EP 2.6.1]

Après quantification des lots monovalents purifiés, l'industriel peut réaliser la formulation des doses vaccinales sur la base des recommandations de l'OMS sur la composition vaccinale à suivre pour la saison. Comme il a été dit, les recommandations officielles se basent sur 3 souches circulantes à l'heure actuelle (H1N1, H3N2 et B) mais certains industriels commencent à développer des vaccins

quadrivalents (Q/V) ajout d'une souche B supplémentaire. La quantité d'hémagglutinine indiquée est généralement de 15 µg pour chaque souche vaccinale (sauf si les données cliniques indiquent l'usage d'une quantité autre) (47). La soumission réglementaire aux autorités qualifiées (FDA, EMA, ANSM...) des données résultantes du contrôle qualité permet de démontrer que le vaccin remplit les critères demandés. Jusqu'à récemment, les industriels devaient faire parvenir aux autorités européennes les données cliniques d'évaluation d'immunogénicité des nouveaux lots de vaccin avant autorisation de mise sur le marché, mais cette exigence a été retirée en 2015 afin de ne pas retarder le procédé de mise sur le marché, et, car la réalisation d'études d'immunogénicité sur des groupes restreints d'adultes sains est apparue peu pertinent pour juger de l'efficacité vaccinale (38).

La **Figure 10** place les différentes étapes décrites précédemment dans le contexte du calendrier annuel de production de vaccin antigrippal. Dans le but d'assurer le respect du calendrier de production, l'industriel peut démarrer le procédé de production d'une ou plusieurs souches vaccinale(s) avant publication des recommandations. Les trois souches vaccinales présentes dans la préparation vaccinale finale sont produites successivement et les industriels démarrent donc la production annuelle par la souche qui présente le risque le moins élevé d'être renouvelée par l'OMS dans la nouvelle composition vaccinale (46).

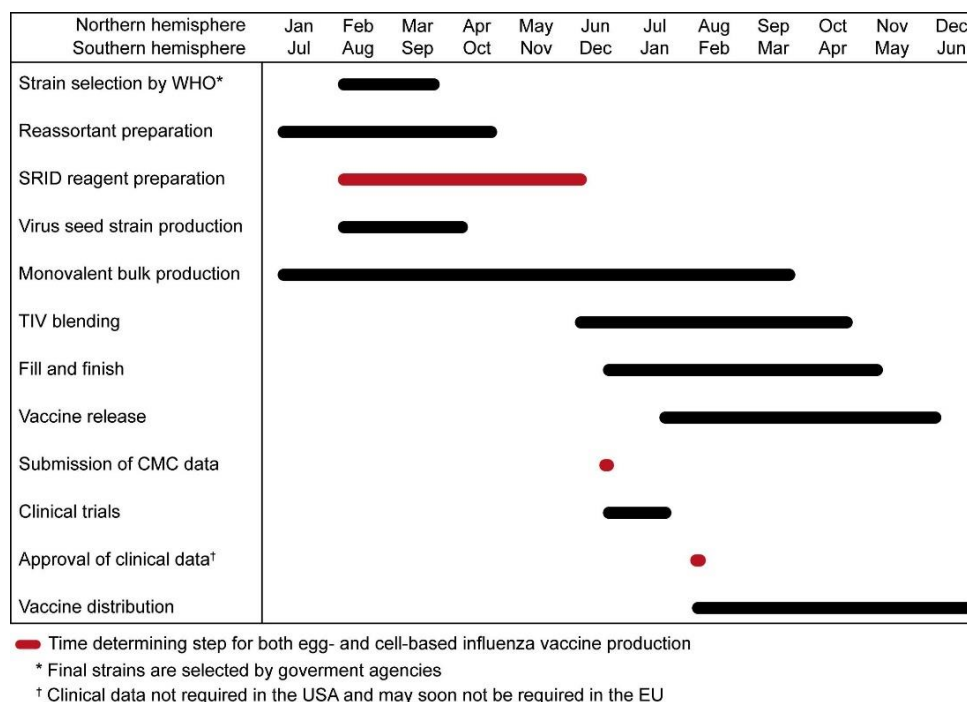


Figure 10 : Calendrier de la production du vaccin antigrippal pour les deux hémisphères. Tiré de (30)

II.2.3.c. Limitations

Les limitations peuvent provenir du procédé en lui-même. Ainsi, pour le procédé par ovoculture, les industriels doivent prévoir à l'avance la quantité d'œufs embryonnés nécessaire à la production (24). La quantité de vaccins trivalent/quadrivalent formulés et délivrés par l'industriel est également déterminée par la productivité de la souche la moins productive.

Certaines limitations de l'ovoculture relèvent de la nature du produit biologique, à savoir le virus influenza, dont le pouvoir infectieux et la capacité de réplication en œuf conditionnent la productivité du procédé. Les mises au point réalisées (préparation de souches réassortantes et délétion du site de clivage polybasique des souches aviaires hautement pathogènes) ont permis de dépasser ces limitations. Cependant, la réactivité du procédé semble insuffisante pour répondre efficacement à une pandémie, notamment face à une souche aviaire hautement pathogène dont la menace est grandissante.

Tableau 3 : Vaccins antigrippaux produits par ovoculture. Issu de (48)

Produit	Dénomination commerciale	Producteur
Vaccin sur œuf inactivé		
Vaccin influenza (trivalent)	Afluria	CSL Limited
	FluLaval	ID Biomedical Corporation of Quebec (GlaxoSmithKline)
	Fluarix	GlaxoSmithKline Biologicals
	Fluvirin	Novartis Vaccines et Diagnostics Limited
	Agriflu	Novartis Vaccines and Diagnostics Limited
Vaccin influenza (quadrivalent)	Fluzone/Vaxigrip	Sanofi Pasteur
	Fluarix Quadrivalent	GlaxoSmithKline Biologicals
	Fluzone/Vaxigrip Quadrivalent	Sanofi Pasteur
	FluLaval Quadrivalent	ID Biomedical Corporation of Quebec
Vaccin sur œuf atténué (LAIV)		
Vaccin monovalent intranasal pandémique Influenza A (H1N1) 2009	X	MedImmune LLC
Vaccin trivalent intranasal	FLuMist	MedImmune LLC

Vaccin sur œuf inactivé pandémique		
Vaccin monovalent pandémique Influenza A (H1N1) 2009	X	ID Biomedical Corporation of Quebec
	X	CSL Limited
	X	Novartis Vaccines and Diagnostics Limited
	X	Sanofi Pasteur
Vaccin monovalent (H5N1)	X	Sanofi Pasteur

II.2.4. Les procédés par culture cellulaire

Les cultures de cellules mammifères et de cellules d'insectes sont utilisées depuis plus de 30 ans, dans l'industrie biopharmaceutique, pour la production de produits recombinants biologiques (protéines d'intérêt thérapeutique ou vaccins prophylactiques) (49,50). La culture cellulaire présente des avantages qui la rendent intéressante vis-à-vis de l'ovoculture pour la mise au point de procédés de production vaccinaux. Elle permet en effet de produire le matériel biologique dans un environnement stérile, contrôlé et automatisé avec une mise à l'échelle relativement facile par l'utilisation de bioréacteurs de grand volume (16). Elle permet également de rendre le procédé non tributaire de l'approvisionnement en œufs embryonnés à l'échelle mondiale (risque de pénurie en cas d'épizootie, de grippe aviaire par exemple, touchant les stocks aviaires). Enfin, les procédés basés sur la culture cellulaire présentent une durée réduite par rapport au procédé d'ovoculture traditionnel, ce qui est un atout majeur afin de réagir le plus rapidement possible dans la situation d'apparition d'une nouvelle souche pandémique (30). En effet, par exemple, les procédés basés sur la culture cellulaire ne nécessitent pas la génération des souches réassortantes hautement répliquatives adaptées à l'ovoculture (51).

Cet outil de production a été utilisé pour l'évaluation et le développement de différentes stratégies de production d'antigènes vaccinaux de la grippe, à savoir la culture virale et la production de protéines virales recombinantes (dont font partie les procédés de production de VLPs). Pour chacune de ces stratégies, les lignées cellulaires utilisées, les vecteurs d'expression et les paramètres de culture seront différents.

II.2.4.a. Les procédés de culture virale par infection

Plusieurs lignées cellulaires ont été testées et validées pour la production de virus influenza à visée vaccinale. A l'heure actuelle, des essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours sur du matériel issu de trois lignées cellulaires (Madin–Darby Canine Kidney, Vero et PER.C6) (52). La mise au point du procédé, ajouté aux essais cliniques, ont conduit à la mise sur le marché, depuis 2007, de plusieurs vaccins influenza produits par culture cellulaire (voir **Tableau 5**).

Une étude a comparé les taux de production obtenus entre le procédé d'ovoculture et la culture cellulaire sur cellules Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) adhérentes cultivées sur microporteurs, avec des titres obtenus légèrement supérieurs pour le procédé œuf traditionnel (voir **Tableau 4**). Un avantage non négligeable est la durée totale du procédé, inférieure à 6 semaines pour le procédé Flublok® par exemple (production d'hémagglutinine recombinante par culture de cellules d'insecte), qui le rend plus réactif que l'ovoculture.

Tableau 4 : Caractéristiques comparées des deux plateformes supportant la production de vaccins influenza autorisées à l'heure actuelle. * pour les souches H1N1 pandémique/HPAI ** Production mondiale de vaccin trivalent inactivé pour la saison 11/12 selon (37)

	Paramètres	Ovoculture	Culture cellulaire
PROCEDE	Rendement de production (PFU par ml)	3.9×10 ⁹ (44)	1×10 ⁹ (44)
	Mise à l'échelle	1-2 œufs/dose	Bioréacteurs de faible à grand volume
	Installations BSL-3 requises	Oui*	Oui*
	Flexibilité	Non flexible	Non flexible
	Longueur du procédé	20-24 semaines(13,53)	< 6 semaines (54)
	Echelle de production	~600 millions de doses en 12 mois**	
CLINIQUE	Développement clinique	Plusieurs vaccins sur le marché	
	N-glycosylation des antigènes	N-glycanes aviaires	Glycosylation de type mammifère

Une caractéristique majeure attenante à la lignée cellulaire, lors de la production de produits biologiques recombinants, est son mode de culture. Les lignées dites conventionnelles (ex : Vero, MDCK) sont adhérentes (sauf exception de MDCK 33016) et peuvent donc être cultivées sur un support solide (plaques de culture à échelle « laboratoire », microporteurs ou flacon roulant/*roller bottle* à moyenne et grande échelle). L'intérêt est cependant grandissant pour des lignées cellulaires néoplasiques (*designer cell lines*), obtenues par transformation de lignées humaines ou animales par des oncogènes viraux ou cellulaires, ou par des gènes cellulaires immortalisant (modification du gène codant pour la télomérase). Ces cellules sont adaptées à la culture en suspension sans ajout de sérum dans le milieu (ex : PER C6®, AGE1.CR®, EB14®/EB66®, 293SF-3F6®) (52).

Tableau 5 : Liste des vaccins antigrippaux commercialisés produits par culture cellulaire. Issu de (48) et (30)

Produit	Dénomination commerciale	Producteur	Plateforme cellulaire	Disponibilité
Vaccin sous-unitaire (trivalent)	Flucelvax	Novartis	MDCK	EU/USA
	FluBlok	Protein Sciences Corporation	Baculovirus – Cellule d'insecte	USA
	Preflucel	Baxter	Vero	EU
Vaccin sous-unitaire (monovalent : H5N1, pH1N1 2009)	Celvapan	Baxter	Vero	EU

II.2.4.b. Les procédés d'expression de protéines et d'antigènes recombinants

Les récents développements qu'ont connus les techniques de biologie moléculaire ont permis dès la fin du 20^{ème} siècle le développement d'une nouvelle classe de produits biopharmaceutiques, développés par génie génétique et produits par expression dans différents modèles cellulaires. Le premier produit biologique recombinant développé a été l'insuline humaine, exprimée en système *E.coli* pour la première fois en laboratoire en 1978, puis autorisée à la commercialisation en 1982 (Humulin® des laboratoires Eli Lilly) (55). En 1986, le premier vaccin sous-unitaire basé sur l'expression d'une protéine recombinante a été mis sur le marché (production de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, HBs, qui s'auto-assemble en nanoparticules, chez la levure

Saccharomyces cerevisiae, conduisant aux vaccins commerciaux Engerix-B et Recombivax-HB) (56,57). A noter également que la même année, la première protéine thérapeutique recombinante produite en cellules mammifères a reçu l'autorisation de mise sur le marché (activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) : initiateur de la fibrinolyse utilisé comme médicament thrombolytique, produit en cellules CHO – *Chinese Hamster Ovary*) (49). Concernant le virus influenza, le premier vaccin recombinant fut approuvé par la FDA récemment en 2013, et commercialisé sous le nom de FluBlok (Protein Science). Ce vaccin sous-unitaire consiste en de l'hémagglutinine recombinante purifiée produite en cellule d'insecte (lignée expresSF+) (54,58).

II.2.5. La stratégie des particules pseudo-virales (VLPs)

Les particules pseudo-virales (PPVs ou VLPs pour *Virus-Like Particles*) constituent l'une des stratégies d'expression d'antigènes vaccinaux basées sur le modèle d'expression de protéines recombinantes. Elles sont définies, de manière générale, comme des **complexes multiprotéiques mimant l'organisation et la conformation du virus natif, mais sans comporter de génome** (59). Cette absence de génome ôte aux particules le caractère répliatif du virus, et de ce fait rend leur utilisation potentiellement plus sécuritaire que pour ce dernier concernant la production d'antigènes à visée vaccinale. Il existe une grande diversité au niveau des VLPs, à la fois structurale et fonctionnelle. En effet, le génie génétique a permis d'accroître d'une part la diversité structurelle existant entre les différentes espèces virales (notamment virus enveloppés ou non-enveloppés) en jouant sur le nombre de protéines virales membranaires ou de matrice exprimées (virus enveloppé), ou le nombre de protéines capsidiques exprimées et formant différentes couches à la surface du VLP (virus non-enveloppés) (60). Au niveau fonctionnel, si les vaccins VLP mis sur le marché à l'heure actuelle sont uniquement basés sur l'expression des antigènes vaccinaux d'un virus donné, de nouvelles stratégies ont récemment vu le jour, illustrées dans la **Figure 11**.

De la même manière que les vaccins conjugués, développés afin d'augmenter le spectre de la réponse immunitaire de certaines prophylaxies antibactériennes (polysaccharides d'origine bactérienne – issus de : *Hemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* – n'entraînant pas de réponse

cellulaire T) par conjugaison avec des antigènes protéiques (protéine « porteuse » : anatoxine tétanique ou diphtérique entraînant une forte réponse T), les VLPs peuvent servir de porteurs pour favoriser la présentation antigénique (60,61). La structure particulière des VLPs permet également d'encapsuler des acides nucléiques ou des protéines pour délivrer ces derniers de manière spécifique à des cellules/organes via des ligands spécifiques exprimés en surface du VLP (permet l'encapsulation de protéines thérapeutiques ou l'obtention de vecteur pour la thérapie génique (60)).

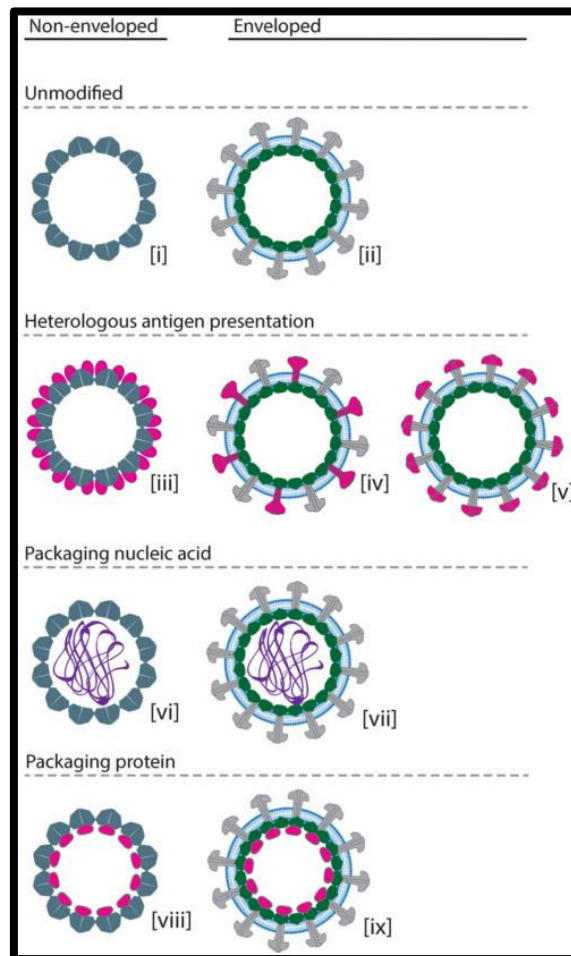


Figure 11 : Diversité de fonction des particules pseudo-virales. VLP issus de sous-unités protéiques non modifiées comme c'est le cas pour les vaccins HPV Gardasil et Cervarix [i] ou les VLP influenzae enveloppés [ii]. Les VLPs peuvent servir de support d'une présentation antigénique par la fusion d'épitopes sur de plus larges antigènes [iii], les co-expression et bourgeonnement de différentes glycoprotéines virales [iv] ou la fusion des domaines « tête » antigéniques de glycoprotéines virales avec les domaines membranaires d'autres glycoprotéines [v]. Également, certains VLPs ont été développés comme véhicule d'acides nucléiques thérapeutiques [vi] et [vii], ou même agents d'encapsulation de protéines [viii] et [ix]. Tiré de (60)

Pour le moment, quatre vaccins recombinants basés sur les particules pseudo-virales ont été mis sur le marché, et de nombreux produits sont en phase d'étude clinique (cf **Tableau 6** pour le détail des vaccins VLPs mis sur le marché et des vaccins VLP influenza en cours de développement (62)). A l'heure actuelle, cependant, les vaccins commercialisés sont produits à partir de VLPs issus de virus non enveloppés (expression de protéines de capsid pour HBV et HPV), mais plusieurs bioprocédés vaccinaux basés sur des VLPs enveloppés sont en cours de développement avec des vaccins en phase d'étude clinique. Les bioprocédés des vaccins anti-influenza basés sur la stratégie VLP seront détaillés dans la troisième partie de cette thèse.

Tableau 6 : Exemples de vaccins prophylactiques produits à partir de particules pseudo-virales (VLPs)

Type	Production system	Antigène	Indication	Nom	Statut
Non enveloppé	Cellules mammifère	Protéine de structure	HBV	GenHevac B [®]	AMM
	Levure		HBV	Engerix-B [®] , Recombivax HB [®]	AMM
	Système baculovirus/cellules d'insecte		HPV	Cervarix [®]	AMM
	Levure		HPV	Gardasil [®]	AMM
Non enveloppé (chimère)	Levure	Protéine	Malaria	MalariVax	Phase III
	Bactérie	Protéine matricielle M2	Influenza A	ACAM-FLU-A	Phase I
Enveloppé	Plante	Protéine d'enveloppe (HA,NA)	Influenza A	X (MEDICAGO)	Phase III
	Insecte/baculovirus		Influenza A	Cadiflu	Phase III
Enveloppé (virosome)	Cell-free		Influenza A	Inflexal [®] V	AMM

**PARTIE II : Le cycle viral infectieux et les études
structurales basées sur le modèle des particules pseudo-
virales d'influenza**

I. Le cycle viral infectieux

I.1. Vue d'ensemble et stratégies vaccinales associées

Les mécanismes des processus d'entrée, de réplication et de bourgeonnement ne sont pas déterminés de manière exacte à l'heure actuelle. Dans ce chapitre sont donc présentés les modèles en vigueur développés, notamment concernant l'entrée virale et le bourgeonnement des néo-virus à la membrane cellulaire, car ces mécanismes sont particulièrement pertinents pour éclairer respectivement la réponse immunitaire entraînée par l'administration de VLPs grippe et leur production. La **Figure 12** montre une vue d'ensemble du cycle viral. Au niveau de la membrane cellulaire, le virus va se lier à ses récepteurs avant internalisation et formation d'une vésicule d'endocytose. Dans l'endosome, un changement de conformation protéique va permettre la fusion membranaire et la libération des ARNs viraux. Ces derniers vont pouvoir être transportés au noyau où va être réalisée la synthèse d'ARN messager (mRNA) et la réplication d'ARN viral. À partir de ces ARN messagers vont être synthétisées les protéines virales au niveau du cytosol (protéines internes) et du réticulum endoplasmique (ER) (protéines membranaires). Enfin, la migration des différentes protéines virales au niveau de la membrane cellulaire, de même que le recrutement des nouveaux segments d'ARN viral issus de la réplication, vont permettre l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions. Comme le montre également la **Figure 12**, l'immunité humorale ou cellulaire de l'hôte intervient aux différentes étapes du cycle infectieux. La réponse vaccinale engendrée par les vaccins inactivés n'est pas optimale, bien qu'elle génère une réponse humorale anti-HA corrélée avec une protection contre l'infection engendrée par la souche vaccinale (faible réactivité croisée entre sous-types et faible immunité cellulaire) (51). Dès lors, différentes stratégies vaccinales sont étudiées afin de déclencher une réponse immunitaire se rapprochant de la réponse obtenue lors d'une infection « naturelle ». Les nouvelles approches étudiées comprennent par exemple la génération d'anticorps ciblant la queue (domaine fortement conservé) de HA et inhibant la fusion membranaire, d'anticorps ciblant le canal à protons M2 afin d'inhiber la libération des ARNs viraux (13,51). Le but recherché est celui d'un vaccin universel, entraînant une réponse immunitaire variée, croisée entre les souches et durable, qui éliminerait ou limiterait le recours à une vaccination annuelle (13,51).

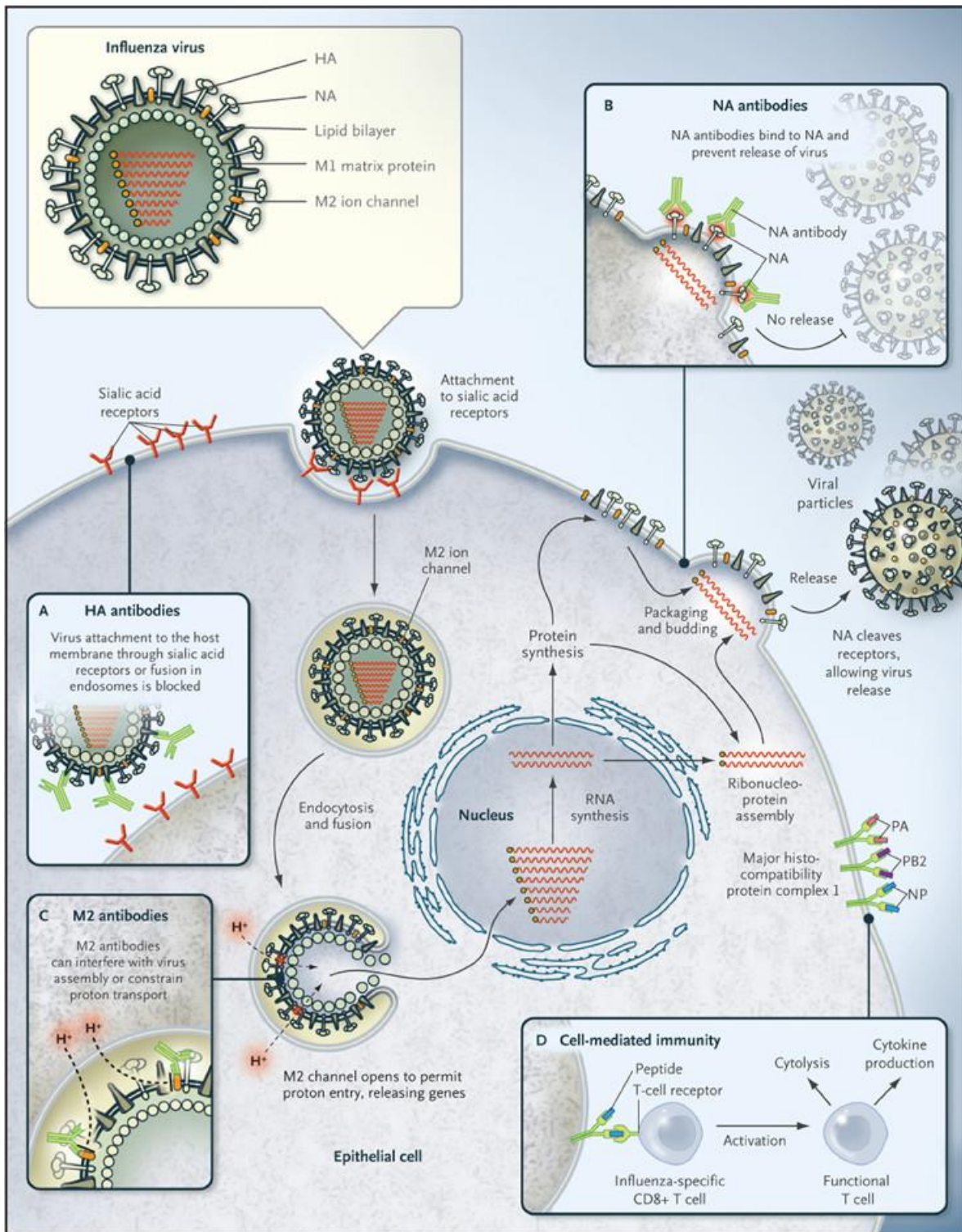


Figure 12 : Le cycle infectieux du virus influenza et les mécanismes immunitaires associés. A Génération d'anticorps anti-HA inhibiteurs de l'attachement et la fusion membranaire. B Génération d'anticorps anti NA inhibiteurs de la libération des nouveau virions C Génération d'anticorps ciblant le canal à protons M2 afin d'inhiber la libération des ARNs viraux. D Génération d'une réponse immunitaire cellulaire T. Tiré de (51)

I.2. Interactions entre le virus Influenzae et l'épithélium respiratoire

Le virus influenza est transmis principalement par voie aérienne directe et cible les cellules de l'épithélium respiratoire après avoir traversé le mucus. Les virus saisonniers entraînent chez une majorité des individus une atteinte des voies aériennes supérieures, tandis que les souches pandémiques peuvent atteindre les voies respiratoires inférieures, principalement chez les sujets à risque (63). L'hémagglutinine virale, par son domaine HA1 (tête globulaire), se lie aux résidus d'acides sialiques (ou N-acétylneuraminique ou NANA) des glycoprotéines/glycolipides à la membrane cellulaire. Par ailleurs, le virus doit donc franchir au niveau pulmonaire les premières barrières de l'immunité, à savoir les mucines (glycoprotéines présentant une forte densité d'acides sialiques) et lectines (protéines inhibant les glycoprotéines membranaires virales) de l'hôte (64) avant de pouvoir venir se fixer à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire.

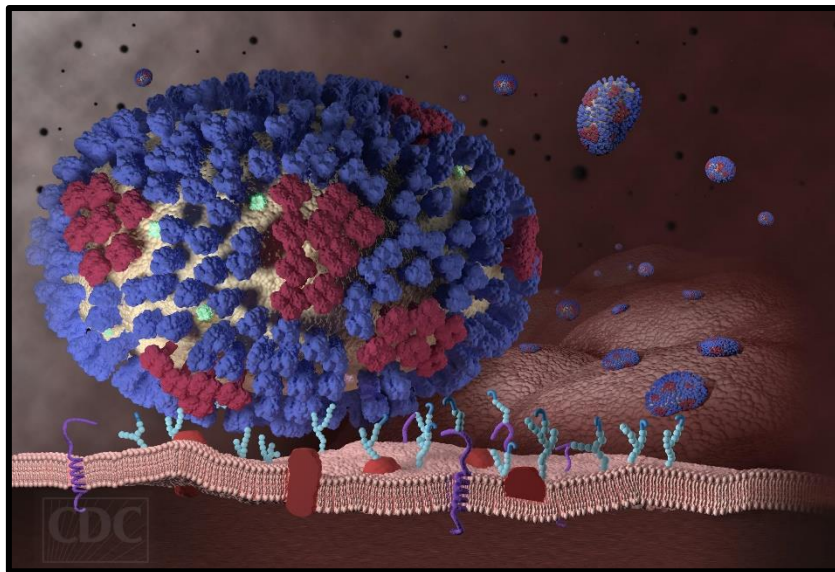


Figure 13 : Représentation des interactions entre le virus influenza et les résidus d'acides sialiques à l'extrémité des glycoprotéines membranaires. Tiré de (6).

La spécificité d'une souche virale pour un hôte relève de différents déterminants, à commencer par ceux caractérisant l'entrée virale. Il a été déterminé que la spécificité de la liaison entre l'hémagglutinine et son récepteur était dépendante du type de liaison o-galactosidique entre l'acide sialique et le résidu galactose qui le précède (65). Ainsi, les virus influenza aviaires se lient préférentiellement aux acides sialiques α -2,3 galactose, tandis que les souches humaines se lient préférentiellement aux acides sialiques α -2,6 galactose (63,66). La conformation du récepteur du domaine HA1 va

orienter sa capacité de lier un oligosaccharide donné en fonction de la topologie de ce dernier (différente selon le type de liaison α -2,3 ou α -2,6). Cependant, il a été montré que l'affinité et l'avidité de HA1, conditionnant le pouvoir infectieux, est aussi influencée par la conformation du ligand (substituants fixés sur le glycane, longueur et embranchements) (66). La présence et répartition des différents types d'acides sialiques dans l'épithélium respiratoire de l'hôte, variable suivant les espèces, va de ce fait conditionner le pouvoir infectieux du virus (voir **Figure 14**). Ainsi l'infection par le virus influenza est, chez l'homme, limitée le plus fréquemment à une atteinte du système respiratoire (cf partie I.3). Alors que les espèces aviaires présentent également des acides sialiques α -2,3 et α -2,6 dans le tractus intestinal où il va y avoir également un tropisme viral (12). Le porc est, lui, vu comme un hôte intermédiaire potentiel dans la génération de nouvelles souches par cassure antigénique, car il exprime les deux types de liaisons dans son tractus respiratoire.

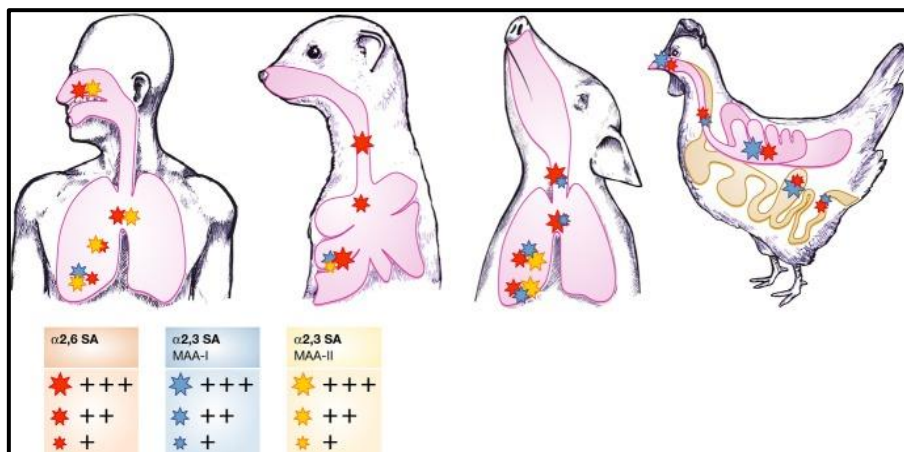


Figure 14 : Distribution globale des glycanes avec acide sialique terminal au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire de différentes espèces (par coloration à l'aide de différentes lectines *Maackia amurensis* agglutinin (MAA)). Tiré de (12)

I.3. Entrée virale

La liaison membranaire initie l'entrée virale par endocytose induite par les récepteurs. Il y a internalisation du virus par invagination de la membrane cellulaire et formation d'une vésicule d'endocytose. Le mécanisme exact d'induction de l'endocytose n'est pas déterminé. Des études montrent que la liaison du virus de morphologie sphérique aux récepteurs cellulaires peut entraîner l'activation de récepteurs aux tyrosine kinases tels que le récepteur EGFR (67), entraînant par la suite l'activation de voies de signalisation conduisant à la formation de puits recouverts de clathrine et l'internalisation (68).

La vésicule formée va par la suite fusionner avec d'autres vésicules pour former un endosome (22,69). Au cours de la maturation d'un endosome, un mécanisme d'acidification s'opère (via des pompes à protons ATP-asiques vacuolaires). Cette acidification est à l'origine de deux modifications. D'abord, elle provoque une diminution du pH dans le virus grâce à l'apport de protons par le canal ionique M2, ce qui induit une diminution des interactions des protéines M1 avec la membrane et les ribonucléoprotéines. Cela va entraîner un détachement de la couche de protéines M1 pour donner une membrane virale plus malléable et propre à la fusion et faciliter la libération du génome viral (70). Deuxièmement, la protonation de HA1 provoque un changement de conformation de l'hémagglutinine virale menant à la présentation d'un peptide de fusion de la sous-unité HA2 à la membrane endosomale et la fusion membranaire (22,70). Il a également été déterminé que l'acidification entraînait une fragmentation des virus filamenteux dans l'endosome (71). Un clivage efficace de l'hémagglutinine est nécessaire à l'infectivité du virus, et la nature du site de clivage est également un facteur de virulence du virus influenza ((2), cf partie I.4). Les segments d'ARN sont ensuite libérés dans le cytosol où ils pourront rejoindre le noyau cellulaire.

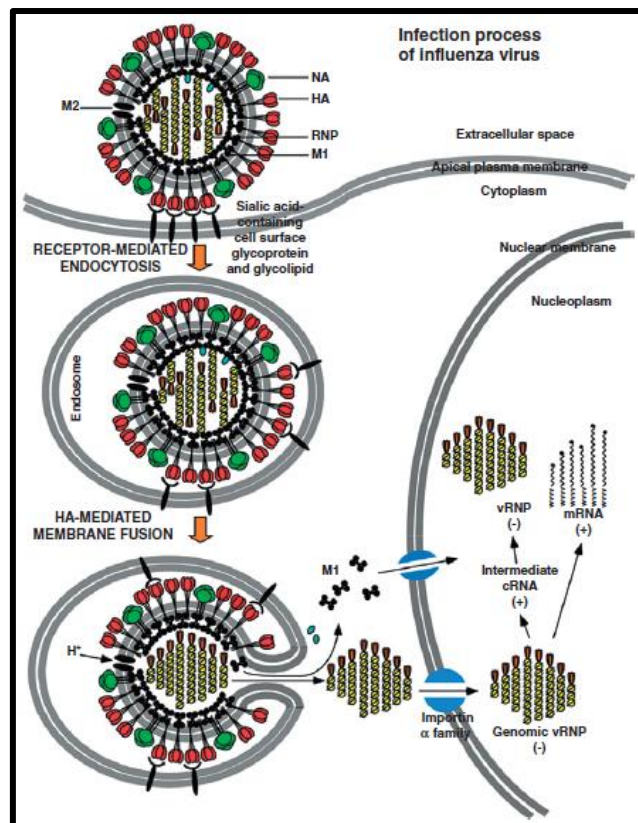
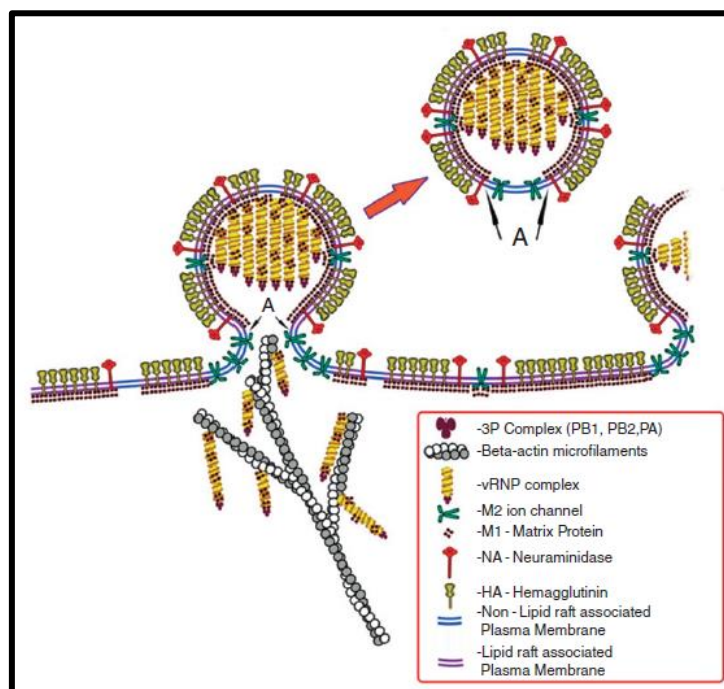


Figure 15 : Entrée du virus Influenzae. Tiré de (72)

I.4. Transcription, réplication virale et transport

Contrairement à la plupart des virus à ARN négatif, la transcription et la réplication du génome d'influenza se déroulent dans le noyau cellulaire. Ainsi, les segments d'ARN viral vont entraîner la production d'ARN messager dans le noyau et la traduction en protéines virales qui va s'en suivre, mais aussi la génération d'ARN complémentaire (cRNA) positif qui va servir à la réplication virale (production de nouveaux segments d'ARN viraux). Les segments d'ARN vont interagir avec les protéines NP afin de donner les nucléocapsides (ou ribonucléoprotéines) virales. Le complexe polymérase viral, formé des protéines PB1, PB2 et PA, s'associe aux nucléocapsides. PB1 est une endonucléase et une ARN polymérase qui joue un rôle dans la réplication et la transcription virales et se lie à la région promotrice des segments d'ARN viraux. L'interaction de PA avec PB1 est nécessaire à l'élongation durant la transcription, alors que PB2 permet d'initier la transcription (8). Après synthèse, les ribonucléoprotéines sont transportées au cytoplasme par les protéines M1 et la protéine d'export nucléaire NS1/NEP (7). NEP (pour *Nuclear Export Protein*) s'associe avec M1 à son domaine C-terminal et avec le récepteur cellulaire d'export nucléaire Crm1 (ou exportine-1) par son domaine N-terminal, afin d'organiser le transport des nucléocapsides virales du noyau au cytoplasme (8). De là, les microfilaments d'actine et les radeaux lipidiques semblent aider au transport des RNP, qui s'y lie (72).



I.5. Assemblage viral et bourgeonnement

L'hémagglutinine est traduite sous la forme d'un précurseur (HA0). Après quoi, les monomères d'HA0 sont assemblés sous la forme d'homotrimères à l'aide de protéines chaperonnes, et gagnent la membrane plasmique par le biais de l'appareil de Golgi, où elles sont glycosylées (22). Comme dit précédemment, l'hémagglutinine sous forme HA0 doit être clivée en deux sous-unités, HA1 et HA2, pour permettre de réaliser la fusion des membranes virale et endosomale. L'opération permet la libération du peptide de fusion à l'extrémité N-terminale de HA2. Suivant le site de clivage, ce dernier intervient durant le transport intracellulaire ou au niveau de la membrane plasmique, par des protéases extracellulaires (22). La nature particulière du site de clivage des hémagglutinines aviaires H5 et H7 (site de nature polybasique pouvant être clivé par un ensemble de protéases intracellulaires, contrairement au clivage extracellulaire d'un seul résidu arginine opéré classiquement pour les autres HA) augmente la pathogénicité des souches correspondantes (souches aviaires HPAI) (22).

La morphogénèse et le bourgeonnement des virions se déroulent en plusieurs étapes, détaillées dans la **Figure 17**. C'est un phénomène complexe faisant interagir des facteurs viraux et cellulaires. De manière générale, les virions s'assemblent et bourgeonnent au niveau des radeaux lipidiques au pôle apical des cellules épithéliales (68,73). Ces radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane, enrichis en cholestérol et sphingolipides, où les protéines HA et NA sont associées dans le cas présent. L'hémagglutinine (et probablement également la neuraminidase) a la capacité de modifier la courbure de la membrane cellulaire, ce qui entraîne l'initiation du processus de bourgeonnement lorsque les protéines d'hémagglutinine sont concentrées au niveau du site de bourgeonnement (par coalescence des radeaux lipidiques). La protéine M1 effectue des liaisons avec les domaines cytoplasmiques et transmembranaires de HA et NA. Il a également été déterminé que M1 forme des multimères lorsqu'elle interagit avec les phosphatidylsérines contenues dans la membrane plasmique, même en l'absence d'autre protéine (74). Ces différentes liaisons entraînent la polymérisation de protéines M1 à la face membranaire intracytosolique, ce qui permet de continuer le phénomène de courbure positive initié par HA et NA (74). De plus, le recrutement des protéines NP et des ribonucléoprotéines virales va se réaliser par le biais de M1, qui va servir de site

d'appariement à ces dernières (68). La protéine M2 apparaît en dernier lieu. Cette dernière n'est habituellement pas retrouvée dans les radeaux lipidiques, ce qui explique son degré d'incorporation relativement faible par rapport à HA et NA. M2 va effectuer des liaisons avec M1 et jouer un rôle dans le processus de scission membranaire. Le recrutement de M1 par M2 au niveau de la zone de bourgeonnement (où les radeaux lipidiques entraînent une concentration élevée en cholestérol) va entraîner la liaison de molécules de cholestérol à cette protéine, ce qui va d'une part stabiliser M2 au niveau du site et favoriser une courbure négative de la membrane. Au fur et à mesure du bourgeonnement, M2 va être concentrée en périphérie du site, à la frontière entre la zone de bourgeonnement – enrichie en lipides ordonnés – et la membrane plasmique. A partir d'un certain degré de courbure négative, la zone basale de bourgeonnement est assez resserrée (~ 10 nm) pour entraîner la scission membranaire et la libération du virion néo-formé (73). A ce moment intervient la neuraminidase virale qui va permettre la libération du virus de la cellule hôte par lyse des acides sialiques à la membrane cellulaire. On devine que la balance entre les activités HA et NA pour une souche virale donnée va conditionner son pouvoir infectieux (75).

Il est important de rappeler qu'il n'existe cependant pas de mécanisme de contrôle aux différents niveaux du processus, ce qui explique la fréquence élevée de production de particules non infectieuses : des particules pseudo-virales ne contenant pas de RNPs ou des particules partiellement complètes, dites « défectueuses interférentes » (3). Par ailleurs, les détails des mécanismes moléculaires conditionnant le degré de courbure de la membrane plasmique n'ont pas été totalement mis en lumière. La partie suivante détaille les éclaircissements apportés par l'utilisation des particules pseudo-virales dans la compréhension du mécanisme de bourgeonnement du virus influenza.

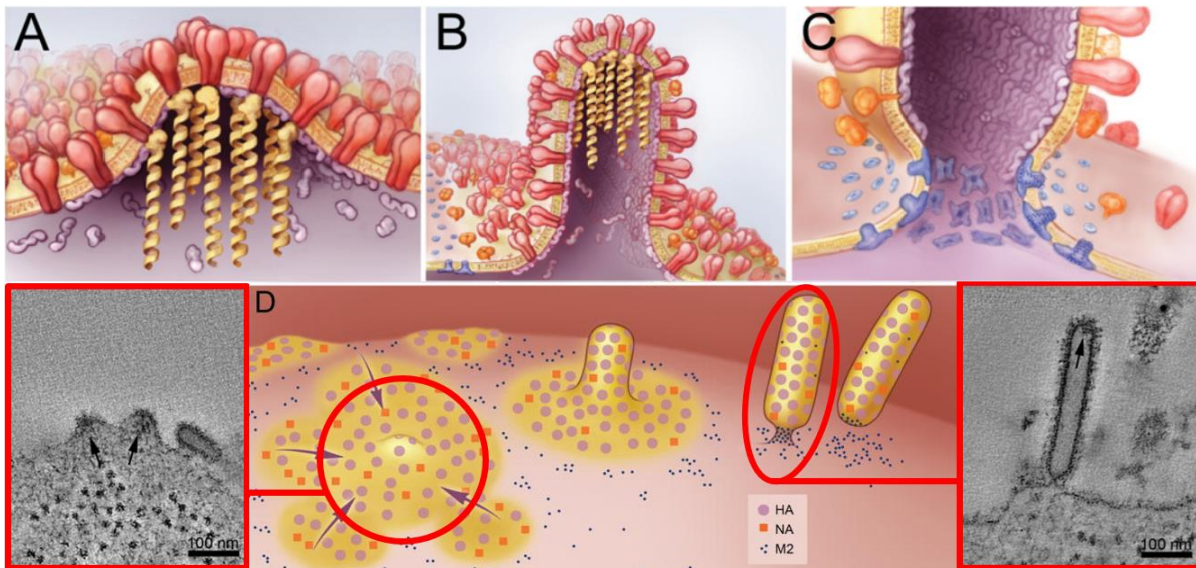


Figure 17 : Modèle du bourgeonnement du virus influenza. A : regroupement de HA et NA par l'intervention de radeaux lipidiques ; B : Elongation de la particule virale par polymérisation de M1 ; C : Scission membranaire par concentration de M2. Tiré de (68)

II. Apport du modèle d'étude des particules pseudo-virales dans la caractérisation du processus de bourgeonnement d'influenza

Les études structurales caractérisant le(s) rôle(s) respectifs des différentes protéines virales dans le processus de bourgeonnement ont constitué le premier emploi des particules pseudo-virales d'influenza. Le modèle des particules pseudo-virales permet en effet d'étudier l'expression d'une protéine virale unique ou d'une sélection de protéines sur différents modèles cellulaires. Ces études ont permis d'éclaircir le processus de bourgeonnement, mais il n'existe cependant pas de modèle parfait du fait de la complexité inhérente à ce dernier. Le **Tableau 7** ci-dessous a pour objectif de résumer les conclusions principales des études structurales menées sur le sujet.

Tableau 7 : Etudes structurales réalisées au sujet de l'expression in-vitro des protéines d'influenza en cellule mammifère

Année	Modèle cellulaire	Système d'expression	Conclusion(s)	Source
1999	COS-1	Plasmides + plasmide rapporteur	<ul style="list-style-type: none"> • La surexpression de M2, NS1 et NS2 inhibe la formation de VLPs • Il existe un effet dose dépendant de M1 sur la production de VLPs, contrairement à HA et NA 	(76)
2000	COS-1	ARN pol T7	M1 constitue la force motrice majeure dans le processus de bourgeonnement	(77)
2000	HEK 293T	Plasmides	Le niveau d'expression de M1 est le paramètre le plus influant sur le niveau de production de VLPs	(78)
2007	HEK 293T	Plasmides	<ul style="list-style-type: none"> • L'expression unique de HA est suffisante pour entraîner une courbure membranaire positive et un bourgeonnement • La co-expression de NA/M1 avec HA augmente leur relargage 	(79)
	CV1, HeLa T4, Vero, COS-7	ARN pol T7	<ul style="list-style-type: none"> • L'expression unique de M1 entraîne un niveau de relargage de M1 bas avant nécrose cellulaire (expression forte mais relargage faible) • La co-expression de NA et HA avec M1 augmente son relargage 	
2008	HEK 293T	Plasmides	La queue cytoplasmique de M2 interagit avec M1 et influence l'assemblage viral au niveau du site de bourgeonnement	(80)
2010	COS-1, HEK 293T, MDCK	Plasmides	<ul style="list-style-type: none"> • L'expression unique de M1 n'entraîne pas de bourgeonnement • L'expression de M1 modifiée avec un signal d'adressage membranaire, ou sa co-expression avec M2 entraîne le bourgeonnement (niveau bas) 	(81)
2015	HEK 293T	Plasmides	<ul style="list-style-type: none"> • Le relargage de M1 est entraîné par HA ou NA 	(75)

-
- Lorsque le gène M est exprimé seul, la membrane plasmique n'est pas remodelée
 - L'expression unique de HA seule, NA seule ou HA et NA entraîne un fort remodelage membranaire, avec des protusions quasi-filamenteuses et/ou irrégulières, et le relargage de particules
 - La co-expression de M avec HA et/ou NA entraîne des protusions filamenteuses plus droites et ordonnées
 - M1 semble former une sous-couche membranaire induisant le regroupement de HA et NA en protusions, et promeut l'expression de particules filamenteuses
 - La co-expression de M1 et M2 n'entraîne pas de relargage
 - Lorsque HA et NA sont co-exprimés, ils apparaissent sous forme de regroupements de taille variable à la surface du VLP filamenteux
-

Les premières études réalisées sur le sujet ont conclu que la protéine matricielle M1 était nécessaire au processus de bourgeonnement et constituait la force motrice majeure de ce dernier. Ce résultat était cohérent avec d'autres modèles tels que la protéine Gag du VIH, dont le rôle structural est proche de M1 puisque, après adressage, elle s'assemble également à la face interne de la membrane cellulaire avant insertion des ribonucléoprotéines virales (81,82). Cependant, toutes ces publications se sont basées sur un système de particules incompétentes à se répliquer, mais résultantes de l'expression de plus de gènes que nécessaire pour la production de VLPs à des fins vaccinales (83). Le problème relève dès lors du grand nombre d'interactions intracellulaires entre les différentes protéines virales (cf partie I.4) qui rendent ce modèle peu pertinent pour étudier le rôle spécifique d'une protéine membranaire. D'un autre côté, la régulation virale de la synthèse protéique est absente

et la surexpression de M1 obtenue via le système basé sur le virus de la vaccine outrepassa les limitations intracellulaires à son transport membranaire (68,75).

Chen et al. (2007) ont exploré en profondeur le bourgeonnement de VLPs suivant plusieurs modèles cellulaires et systèmes d'expression. Ainsi, ils ont pu montrer que HA et NA, et non M1, étaient nécessaires au phénomène de bourgeonnement (79). En effet, la transfection unique du gène codant pour M1 permettait une expression intracellulaire élevée, mais un bourgeonnement négligeable. Par la suite, le même groupe a montré que l'interaction entre M1 et la queue cytoplasmique de M2 était importante pour l'incorporation de M1 dans les virions néo-formés de même que pour un bourgeonnement efficace (80). Wang et al. (2010) ont exploré le mécanisme entraînant le défaut de bourgeonnement de VLPs suite à l'expression unique de M1 et en ont déduit que l'absence d'un signal d'adressage membranaire en était responsable (81). En effet, exprimée seule, M1 est retrouvée au niveau du noyau et de la région peri-nucléaire (en lien avec le fait qu'elle comporte un signal de localisation nucléaire lui permettant de servir d'intermédiaire dans l'export nucléaire des vRNPs (3,84)). Cependant, les auteurs ont également démontré que la redirection de M1 à la membrane cellulaire, soit par la co-expression de M2, soit par l'ajout d'un signal d'adressage, entraînait la production de VLPs comprenant M1 (81).

Récemment, Chlanda et al. (2015) ont mené une étude approfondie sur l'impact de l'expression d'une ou plusieurs protéines virales par transfection en système mammifère (HA, NA, M1 et M2 résultantes de l'expression du gène M) (75). Contrairement aux études précédentes, ils n'ont pas détecté de relargage de M1 même lors de la co-expression de M1 et M2. Par ailleurs, en étudiant la morphologie des particules issues de l'expression unique de HA et NA (hétérogène et pléomorphique, distincte des particules virales), ils ont émis l'hypothèse que le relargage de ces particules était réalisé de manière non spécifique, par distorsions membranaires causées par la forte densité de protéines virales inductrices de courbures à la membrane. Cependant, et contrairement aux résultats de Chen et al., la co-expression de NA et/ou HA avec M entraîne le bourgeonnement de VLPs droits et filamenteux d'organisation bien définie, similaires aux structures virales.

Ainsi, bien que chacune des protéines d'enveloppe du virus (HA et NA) soit capable d'induire par elle-même le bourgeonnement de VLPs, ce phénomène est augmenté de façon synergique lorsqu'elles interagissent pour produire des VLPs structurellement

proches des particules virales (73,75). Il faut cependant noter l'importance du modèle cellulaire dans les études d'analyses structurales, qui joue grandement autant au niveau de l'expression et le transport protéiques qu'au niveau du bourgeonnement, ou des mécanismes différents peuvent conduire à la production de particules virales ou pseudo-virales. Ainsi, les études structurales ont en grande majorité été réalisées en cellules mammifères, car c'est le modèle le plus pertinent afin de se rapprocher des conditions d'infection et caractériser le processus de bourgeonnement chez l'homme.

Cependant dans une optique de procédés de production vaccinaux, différentes plateformes sont utilisées pour la production des VLPs grippe. Par exemple, les deux procédés les plus avancés à l'heure actuelle sont basés sur la production en cellule d'insecte et en plante (*N. tabacum*). Dès lors, la recherche réalisée sur la production de VLPs *Influenzae* sur ces différentes plateformes d'expression touche au domaine des bioprocédés. La partie III de cette thèse dresse l'état de l'art des bioprocédés utilisées pour la production de vaccins *Influenzae* basée sur la stratégie VLP.

**PARTIE III : Etat de l'art des bioprocédés de production de
particules pseudo-virales d'influenza**

I. Introduction

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un manuscrit destiné à être publié dans le journal *Expert reviews of vaccines* et dénommé ***Advances in Influenza Virus-Like Particles bioprocesses***. L'objectif fut de dresser l'état de l'art des réalisations sur les VLPs influenza depuis les premières preuves de concept il y a 15 ans de cela. En effet, malgré un certain nombre de revues centrées sur les particularités de la réponse immunitaire engendrée par ce matériel vaccinal, et des revues générales sur les bioprocédés attendant aux particules pseudo-virales dans leur ensemble, aucune revue n'avait abordé spécifiquement l'aspect bioprocédé des VLPs grippe.

Cette revue détaille les trois plateformes cellulaires et quatre types de stratégies développées à l'heure actuelle pour la production de VLP grippe. Après avoir détaillé les particularités attendantes à ces différentes plateformes, l'accent a été mis sur les paramètres à prendre en compte pour la production de ce matériel vaccinal. En effet, contrairement au procédé de culture virale par infection de culture cellulaire, où la production de matériel viral est régulée de façon inhérente au niveau intracellulaire par des interactions virus-cellule hôte, la production de VLPs relève de l'exploitation du fait que la « simple » expression d'un nombre réduit de protéines virales (HA, NA, M1, M2) conduit au bourgeonnement dans les systèmes cellulaires à l'étude.

L'essor de la stratégie VLP s'explique par un développement des techniques moléculaires qui ont rendu accessible le développement de vaccins par ingénierie génétique. Les recherches basées sur cette stratégie se sont déjà traduites de manière concrète avec l'autorisation de vaccins VLP pour d'autres pathogènes tel que détaillé dans la partie II.2.5.

II. Les particules pseudo-virales d'influenza : procédés de production et de purification

Advances in Influenza Virus-Like Particles bioprocesses

Laurent Durous^{1,2}, Manuel Rosa-Calatrava², Emma Petiot^{1,3}.

1 Univ Lyon, GEMBAS Team, CNRS UMR 5246, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne cedex, France

2 Univ Lyon, VirPath Team, International Center for Infectious diseases Research, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine RTH Laennec, LYON, France

3 CPE Lyon, Bâtiment Hubert Curien, 43 bd du 11 Novembre 1918, LyonTech – La Doua, Villeurbanne, France

ABSTRACT

Influenza Virus-like Particles are one of the most promising vaccine strategy to complement traditional egg-based process and contribute to shorten response time when facing future pandemics. Research programs have taken advantage of the potential of this approach to produce influenza VLPs on a variety of cellular platforms, reaching industrial level of development and recent commercialization. This review aims to give an overview of available strategies for influenza VLP production and their respective stage of development, from small-scale preclinical studies to large-scale industrial processes. We also reviewed recent trends and fulfillments in purification schemes of influenza VLP in regards to quality and potency requirements that go with influenza vaccine manufacturing. Finally, we closely considered how rational design of flu VLP processes can drive future developments of this promising vaccine strategy through in-depth proteomic/glycomic analysis and modulation.

KEY WORDS

Influenza Virus-like Particles (flu-VLP) / Recombinant vaccine / Upstream Process (USP) / Downstream Process (DSP) / Cell culture

HIGHLIGHTS

- Description of cell platforms and techniques used for influenza-VLP production, from small-scale preclinical studies to large-scale industrial processes
- Comparative analysis of influenza protein expression strategies based on evaluation among 70 studies, underlining the most widespread utilization of BEVS-IC system in academic studies with a preference for co-expression over co-infection strategy
- Overview of purification schemes shows implementation of scalable membrane- and chromatography-based processes alongside with process scale-up
- Recent works made process development oriented towards influenza-VLPs now effective, but investigation is still needed on numerous parameters, especially for DSP
- Current quantification methods still impede large-scale process development

- Glycosylation profile of viral antigens, as host-cell proteins embedded in flu-VLP, varies depending of the expression platform and can be modulated to impact immune response

Table of Contents

34		
35		
36		
37	1. INTRODUCTION	48
38	2. UPSTREAM PROCESSES	49
39	2.1. CELL PLATFORMS AND STRATEGIES FOR VIRAL PROTEIN EXPRESSION	49
40	2.1.1. THE INSECT CELL PLATFORM	50
41	• TRANSDUCTION STRATEGY	50
42	• TRANSFECTION STRATEGY	51
43	• INSECT CELL LINES	52
44	2.1.2. THE MAMMALIAN CELL PLATFORM	52
45	• TRANSFECTION STRATEGY	52
46	• TRANSDUCTION STRATEGY	53
47	• MAMMALIAN CELL LINES	54
48	2.1.3. THE PLANT PLATFORM	54
49	2.2. UPSTREAM PROCESS PARAMETERS FOR INFLUENZA VLP PRODUCTION.....	55
50	2.2.1. VIRAL PROTEINS AND GENE RATIOS.....	55
51	• VIRAL PROTEINS SELECTION	55
52	• INFLUENZA GENE RATIOS	56
53	2.2.2. TIME OF INFECTION/CELL DENSITY AND TIME OF HARVEST.....	58
54	2.2.3. CULTURE MEDIUM/FEEDING STRATEGIES AND CULTURE ADDITIVES.....	59
55	3. DOWSTREAM PROCESSES	61
56	3.1. PRE-CLARIFICATION BULK TREATMENT	61
57	3.2. CLARIFICATION	62
58	3.3. CONCENTRATION AND PURIFICATION	63
59	3.3.1. ULTRACENTRIFUGATION (UC)	63
60	3.3.2. MEMBRANE FILTRATION	64
61	3.3.3. CHROMATOGRAPHY	65
62	3.4. POLISHING	66
63	3.5. VACCINE FORMULATION/QUALITY CONTROL.....	66
64	4. THE PRESENT AND FUTURE OF INFLUENZA VLP BIOPROCESSES: IMPLEMENTING RATIONAL	
65	DEVELOPMENT IN PROCESSES TO SUPPORT NEW IMMUNOLOGICAL STRATEGIES	67
66	4.1. TAKING ACCOUNT OF THE GLYCOSYLATION OF VIRAL ANTIGENS.....	67
67	4.2. ADRESSING THE PRESENCE OF NON-INFLUENZA-DERIVED PROTEINS IN FLU-VLP VACCINES	
68	68	
69	5. EXPERT COMMENTARY	69
70		

1. INTRODUCTION

Influenza virus annual epidemics associated with antigenic drift still remains a worldwide public health concern because of their high morbidity and mortality both in humans and animals. In addition, global outbreak risk associated with antigenic shift and consecutive emergence of new pandemic influenza A strains is always on the horizon. Lessons learned from the recent swine and avian pandemic crisis must lead to proper initiatives in order to ensure optimal and rapid responses to the ones to come [1,2].

Since approval in 1945 of the first inactivated vaccine based on whole-virus, vaccination has been extensively used in humans to ensure high seroprotection rates of the populations. From these days, influenza vaccine doses have been predominantly prepared from virus propagation in embryonated hen's eggs. Besides the long-term establishment of this traditional process, it still suffers from different shortfalls, making it not sufficient to face a pandemic crisis. One of its drawbacks is the duration of manufacturing timelines from the annual selection of strains – based on recommendations from WHO – to the delivery of a great number of doses [3]. Indeed, such a manufacturing process annually requires up to six months and billions of fertile eggs, with 1-2 egg(s) on average per vaccine dose, to provide sufficient number of doses. To go further, the recent and repeated zoonotic diseases caused by avian influenza viruses, and particularly Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1, raised new concerns [4]. Indeed, first, epizootic outbreaks could result in a shortage of egg supply for epidemic or pandemic vaccine manufacturing and second, the use of egg- platform for such avian influenza strains commonly provides low viral yields [5]. One major problematic of the production either on egg- or cell-based platforms is the influenza strain adaptation to the production platforms and the associated mutations which cause decrease in antigen stability and/or vaccine potency [6].

In the last twenty years, the advances of molecular biology techniques based on viral genes sequencing and vectorization permitted the production of subunit or complete viral vaccines. Such strategies offer the advantages to ensure antigenic stability of the vaccine doses and give access to more flexible production methods including a large variety of production platforms and strategies.

One of the promising production strategies for influenza vaccine resides in Virus-like particles (VLPs). Such non-replicating particles are formed by self-assembly and budding of influenza

32 proteins at the cell membrane. Consequently, VLPs display a high density of surface influenza
33 antigens as mimetic particles of wild-type virus and thus enhance immune response. From
34 proof-of-concept in the early 2000s to recent clinical trials, numerous studies reported a
35 better immunogenic response consecutive to VLP administration than with soluble
36 recombinant HA or in some case with inactivated vaccine strains (reviewed in [7–10]).
37 Recently, phase II clinical studies proved VLP vaccination elicits a strong and persistent
38 immunological response in humans [11–14]. However, VLPs vaccine manufacturing and
39 process development must ensure high production yields, product potency and efficiency in
40 order to compete with the traditional production process and to be proposed as a valid
41 complement or alternative. In this way, such vaccines require, on a manufacturing point of
42 view, the optimization of numerous variables regarding upstream and downstream process.

43 The present paper is based on the review of about 70 articles, covering more than 15 years of
44 work on the influenza-VLP production strategy, from first stage demonstrations at small-scale
45 (preclinical studies) up to large-scale industrial processes. We intended here to compile and
46 summarize the current stage of development of influenza cell culture-based VLP bioprocesses.
47 Notably, the range of this review can overpass influenza-based VLPs, because these are
48 structurally similar as other enveloped virus-like particles (e.g. HIV1-VLP).

49 **2. UPSTREAM PROCESSES**

50 **2.1.CELL PLATFORMS AND STRATEGIES FOR VIRAL PROTEIN** 51 **EXPRESSION**

52 To date, several cell platforms – insect, mammalian, and plant cells – have been used to
53 produce influenza VLPs. For each of these cell platforms, appropriated gene transfer strategies
54 were designed and optimized to introduce influenza genes within the host-productive cells.
55 **Figure 1** is summarizing the production strategies used, including three cell platforms (insect,
56 mammalian, and plant cells) and four gene transfer techniques (transduction, transient/stable
57 transfection and agroinfiltration). Those techniques vary by their combination of gene vectors
58 (i.e. baculovirus, plasmid and *A. tumefaciens*) and gene promoters for influenza protein
59 expression in the chosen cell platform.

60 During the first stage of process development, evaluation and selection of the productive cell
61 platform is a critical step. Indeed, production cell lines are evaluated and selected on the basis

62 of: (i) their approval by regulation agencies; (ii) their growth capacities (preferentially in
63 serum-free media) and ability to reach high cell densities; (iii) their scalability; (iv) their
64 permissivity to efficient vectorization process; (v) their ability for high-level recombinant
65 protein expression with desired post-translational modifications [15].

66 Nevertheless, to be compared accordingly, each of these production strategies should
67 consider additional relevant information including (i) the co-production of contaminants (i.e.
68 extracellular vesicles, baculoviruses) issued from cell culture, (ii) the specific glycosylation
69 profile of viral antigens, (iii) the variety of host cell protein incorporated in flu-VLP. These
70 characteristics, which are raising a growing interest within the scientific community, will be
71 detailed separately in part 4 of this review.

72

73 **2.1.1. THE INSECT CELL PLATFORM**

74 **• TRANSDUCTION STRATEGY**

75 As other numerous VLPs, flu-VLPs have been successfully expressed in insect cells by using
76 Baculovirus Expression Vector System (BEVS-IC) (first demonstrated in 2001 [8,16]) [17].
77 Baculoviruses (BV) are insect's natural hosts, and the large size of their capsid allows for high
78 cloning capacity (>38 kB) enabling the expression of large polycistronic genes used in VLP
79 systems [18,19]. Foreign protein expression is under control of very late promoters *polH* and
80 *p10*, which allows for constitution of large stock of recombinant baculoviruses (rBVs) by short
81 sequential amplifications before infecting the cell culture.

82 Manufacturers provide kits and detailed protocols for single or co-expression based on BEVS-
83 IC system (reviewed in [20]). Added to the other benefits cited, this explains why this
84 production strategy prevails among academics with 75% of published papers, and also
85 supports some large-scale processes (see part 2.3). The fact the first licensed rHA subunit
86 vaccine, Flublok™, has been produced in the BEVS-IC system, made it proven and recognized
87 for recombinant influenza vaccine production [18]. However, since commercial plasmid donor
88 system usually contains not more than two insertion sites, tedious genetic engineering
89 manipulations are needed in order to obtain the co-expression of multiple influenza genes
90 from a single vector [21]. Another significant drawback of this system is the inherent
91 contamination of the vaccine with baculoviruses or baculovirus DNA.

92 Newly-designed vectors enable multi-gene expression with better flexibility than conventional
93 ones. Palmberger et al. (2013) reported an enhancement of speed and efficiency of VLP
94 generation for HA-M1 co-expression with Multibac system [20]. Concerning residual BVs,
95 Margine et al. (2012) proved that they activate immunity and enhance immunogenicity of VLP
96 vaccine [22]. Thus, residual BV contamination benefits to vaccine potency, but it also
97 constitutes a bias in immunological efficiency determination of influenza VLP themselves and
98 process development, since either upstream and downstream process design cannot totally
99 reduce it [23].

100 • **TRANSFECTION STRATEGY**

101 Transient and stable transfection strategy – offering baculovirus-free flu-VLP production in
102 insect cells – have recently been explored in insect cells. Aldevron and Altravax indicated they
103 developed a transient transfection method for flu-VLP production in insect cells [24]. Recent
104 works based on plasmid-driven protein expression in insect cells with the use of baculovirus
105 early promoters achieved recombinant protein expression level close to those obtained with
106 mammalian cells [25–27]. Large-scale transient transfection appears as an alternative to BEVS
107 worth exploring in the development of future influenza VLP vaccine manufactured in insect
108 cells.

109 Regarding stable transfection strategy, commercial plasmid vectors based on the OpIE2
110 promoter -that enables a constitutive gene expression in insect cells – have been used for
111 stable integration of influenza genetic sequences. However, virus-free expression in insect
112 cells does not achieve similar production levels as BEVS-IC [25] : Hong et al. (2015) showed
113 that production yields of stably transfected cells (with HA, NA, M1, M2) were very low when
114 compared with BV transduction (0,7 µg/mL of total protein vs 3-15 µg/mL HA protein) [23,28].

115 A mixed approach, combining stable transfection with baculovirus transduction has also been
116 reported [28,29]. Hong et al. (2015) subsequently obtained 17 times higher protein expression
117 and 32 times higher HA activity when transducing a stable cell line only expressing M1 and M2
118 proteins with HA- and NA-rBV [28]. Sequeira et al. (2017) also chose to use a combined
119 strategy for the production of their pentavalent H3 VLP [29]. Generating clonal insect cell lines
120 constitutively expressing part of all the influenza genes needed for VLP generation is seen as
121 strategic to ensure reproducibility of the protein expression, limit baculovirus contamination

122 and manage to express a higher number of antigens on the surface of a single VLP while
123 minimizing in the same time the number of gene sequence carried by a single vector (which
124 lowers vector instability). This approach could be relevant for establishing a rapid pandemic
125 vaccine manufacturing by minimizing the number of gene sequences and/or vectors and solely
126 transduce insect cells with the HA and NA genetic sequences from reference strains, but
127 requires, on the other hand, long development and characterization of the novel cell line [24].

128 • **INSECT CELL LINES**

129 For BEVS-IC, commonly used insect cell lines are derived from *Spodoptera frugiperda* (Sf9 and
130 Sf21) and *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4 or “HighFive” and BTI-Tnao38 recently developed
131 [30,31]). Their fast growth rate and ability to grow in suspension in serum-free medium open
132 the way to large-scale production [32]. Also, culture conditions of insect cells line (27°C – no
133 CO₂ needed) make them relatively easy to operate [33]. Krammer et al. (2010) established
134 HighFive as advantageous when compared with traditional Sf9 cells. Using IPL-41 serum-
135 supplemented medium, they demonstrated a 2-log reduction in BV contamination and a
136 probable higher HA content of HighFive-derived VLP [23]. This group and another made
137 comparative evaluations of various cell lines respectively for rHA and rNA protein expression
138 [31,34]. Whereas HighFive cells reveals more suitable for protein expression, Sf9 cells are
139 more efficient in terms of BV production (yields evaluated to 4-10x [34] or 100x [31] more
140 infectious BV particles). These results justify the choice of using Sf9 cells for rBV stock
141 production followed by HighFive cells for the expression of H7N9-VLPs in a recent preclinical
142 study [35].

143 **2.1.2. THE MAMMALIAN CELL PLATFORM**

144 • **TRANSFECTION STRATEGY**

145 First works, published around the year 2000, were demonstrations of the formation of
146 replication-defective particles resulting in the expression of more genes (e.g., polymerase- or
147 nucleoprotein-coding genes) than required for vaccine purpose (reviewed in [8], later works
148 then followed similar strategy than BEVS-IC with a minimal number of genes [36,37]). As for
149 the BEVS-IC system, these previous works were proof-of-concept which demonstrated the
150 occurrence of budding and explored the respective role of the different viral proteins involved
151 in this mechanism.

152 One advantage of transient transfection over the transduction strategy is its high modularity,
153 which permits rapid expression of vaccine antigen with less prior genetic engineering
154 manipulations. Production can be realized by use of transient expression system [37], stable
155 transfection [38,39], or both combined approaches [40] (**FIGURE 1** and **TABLE 3**). For transient
156 expression in mammalian cells, influenza genes are put under the control of strong promoters
157 (CMV pCAGGS). Mono- or poly-cistronic plasmids (see **Section 2.2.1**) are mixed with
158 transfection reagents (mainly lipidic, polymer or mixed reagents). However, the high cost of
159 lipid-based transfection reagents makes them unadapted for large-scale process. A reliable
160 alternative in serum-free medium is offered by using polyethylenimine (PEI), a low-cost
161 cationic polymer [41]. Venereo-Sanchez et al. (2016) reported 86% transfection efficiency at
162 24 h.p.t in 3L bioreactor using PEI [40]. However, the cytotoxicity level of PEI could be a
163 restricting parameter during transfection optimization [42]. Typical added quantity of plasmid
164 is **1 µg DNA/10⁶ cells**, implying the production of large cGMP plasmid stocks for industrial-
165 scale transfection. Stable transfection overpass these problems by, as for insect cells,
166 generating mammalian cell lines constitutively expressing viral proteins under the control of
167 inducible promoters. Several research groups developed this strategy, yielding the
168 constitutive expression of a minimal set of HA and NA proteins [38,40]. However, stable
169 transfection of vaccine antigens in a cell line and its subsequent long characterization is hard
170 to combine with influenza vaccine specifications (seasonal vaccine strains – and consequently
171 HA/NA coding sequences – changes and short response time needed to face pandemic strains)
172 [24].

173 • **TRANSDUCTION STRATEGY**

174 Despite being insect's natural hosts, baculoviruses demonstrated ability to enter mammalian
175 cells [32,43,44], yet entry mechanisms are still not clearly elucidated [18,45]. The absence of
176 replication and low cytotoxicity of baculoviruses in mammalian cells made it a valuable
177 strategy to overcome some drawbacks of BEVS-IC system [43]. Tang et al. (2011) constructed
178 a triple recombinant BV (co-expressing HA, NA and M1 driven by mammalian CMV promoters)
179 to transduce various mammalian cell lines [46]. They determined highest protein expression
180 with HEK 293T cells (see below), while transduction conditions were optimized to compensate
181 for lower efficiency as compared to insect cells with MOI 10-100 times superior than for insect
182 cells transduction (see **Section 2.2.1**).

183 This low transduction efficiency of mammalian cells by baculoviruses is restrictive for large
184 scale production, and can be avoided by the use of other vectors. For example, Schmeisser et
185 al. (2012) developed a modified vaccinia virus Ankara (MVA) system that efficiently
186 transduced Vero cells and enabled single and co-expression of HA, NA and M1 for H5N1-VLP
187 production [47]. Notably, MVA has restricted replication in mammalian cells and no residual
188 MVA particles were detected in VLP preparations.

189 • **MAMMALIAN CELL LINES**

190 Presently, the mammalian cell lines in use are mainly adherent (HEK-293T [22,37,39,46,48–
191 52], Vero [38,47], Hela [37,38], A549 [48] and COS-1 [53]). These adherent cell lines are well
192 documented and, for some of them (e.g. Vero cells MDCK [15]), sustain the large-scale
193 production of numerous viruses by growing in roller bottles or on microcarriers, justifying their
194 use for flu-VLP production. But upstream process scale-up with adherent cells is inherently
195 complex [15,54]. Also, compared to insect cells, mammalian cells require more stringent
196 monitoring, and tedious procedures to obtain a suspension cell line. Notably, the HEK 293SF-
197 3F6 cell line – able to grow at high densities in serum-free suspension – demonstrated the
198 feasibility of bioreactor cultures without utilization of microcarriers for flu-VLP production
199 [40,54,55].

200 **2.1.3. THE PLANT PLATFORM**

201 Plant platform offers a promising alternative to overcome some of the limitations of
202 traditional vaccine manufacturing platform (i.e. ovoculture or BEVS-IC) with high productivity
203 in a short time, limited human-pathogenic agent contamination and low investment costs
204 [56]. Transient gene expression in plants can be realized by infection with replicating plant
205 viral vectors or by *agroinfiltration* with the use of bacterial vectors [57]. Medicago company
206 has developed an *Agrobacterium*-mediated transient expression system in *Nicotiana* plants
207 using agroinfiltration technology [58,59]. The bacterial nature of *Agrobacterium* does not
208 require a high level of genetic manipulation starting from influenza gene sequences, and allows
209 for rapid and low-cost vector production by culture of selected clones. The vector allows for
210 gene shuttling from its Ti plasmid to host cell nucleus, while VLPs bud at the plant plasma
211 membrane and accumulate within the apoplast space [58].

212 Unlike the other systems, Medicago's VLP rely for now on the sole expression of HA. It makes
213 this strategy less stringent for process development and reproducibility by minimizing
214 variables associated to process optimization, but it also requests on the other hand that
215 enough vaccine potency is provided by a single antigen. This production process is currently
216 the approach allowing the shortest manufacturing process, with only three weeks needed
217 from influenza H1N1 sequence release to the first purified H1-VLP lot [59].

218 **2.2.UPSTREAM PROCESS PARAMETERS FOR INFLUENZA VLP** 219 **PRODUCTION**

220 Generation of influenza VLPs is the outcome of complex interactions governing viral protein
221 expression, transport, self-association and budding at the cell membrane [52,60,61]. Then,
222 VLP production in the chosen platform must be designed through adjustment of numerous
223 variables regarding vector design (choice of influenza proteins and their relative expression
224 level) and process engineering (cell culture parameters for optimal vector expression). Also,
225 the fact that a reduced number of influenza proteins are exploited for VLP production – as
226 compared to native virus replication and budding – lead to a loss of interactions that can be
227 partly compensated by manipulating either gene promoters or gene ratios during transient
228 expression [62].

229 **2.2.1. VIRAL PROTEINS AND GENE RATIOS**

230 **• VIRAL PROTEINS SELECTION**

231 As already presented, early studies were designed to elucidate the structural role played by
232 each individual influenza proteins for VLP formation using combinatorial approach. Some
233 works explored single gene expression (cf single expression in **FIGURE 2**). They demonstrated
234 that single expression of HA protein is sufficient for high-level VLPs formation in the case of
235 particular cellular production platforms, as for plant-based system [58]. Also, single expression
236 of M1 in mammalian cell system fails to induce budding [37,53]. Indeed, M1 localizes in the
237 nucleus/perinuclear region in the absence of other viral proteins (i.e. envelope proteins or
238 M2) that redirect it to the membrane [53]. Nevertheless, in most of the cases, multi genes
239 expression systems were tested for influenza-VLP production, and large-scale productions are
240 usually performed with HA, NA and M1 multiple expression [13,40], eventually with M2
241 protein included [38,39,63].

242 Multiple protein expression is mainly justified by obtaining better process yields and better
243 structural conformation of the VLPs. Chen et al. (2007), Choi et al. (2013) and Venereo-
244 Sanchez et al. (2016) obtained higher yields when expressing influenza matrix protein(s) with
245 HA or HA and NA in insect or mammalian cells [37,40,64]. Thompson et al. (2015) mentioned
246 that the various levels of M1 incorporation in VLP between insect and mammalian cell
247 platforms could influence particle fragility [65]. VLP envelope is labile and sensitive to shear
248 and osmotic pressure variations, and the structural role played by M1 could then improve the
249 stability of the particle and DSP yields [66,67]. NA protein was also identified to play a major
250 role for the release of flu-VLP in some production systems as for mammalian cells, while it is
251 not found to be necessary for an efficient budding in the plant system [58]. However, Jutras
252 et al. (2015) showed that co-expression of M2 in plant system led to higher expression of some
253 subtypes of hemagglutinin by modulating the pH along the secretory pathway due to its
254 proton channel activity (HA conformation change is pH dependent) [68].

255 Besides expressing different viral proteins in the same VLP, multiple gene expression can also
256 be used for producing VLP harboring several HA (or NA) subtypes. By using this strategy,
257 manufacturers can reduce production timeline and USP cost by expressing all the vaccine
258 strains in a single batch, in comparison to the production of three to four different monovalent
259 bulk batches required in the classical vaccine manufacturing [69]. Academics [70–72] and
260 manufacturers (Medicago clinical trial NCT02768805) already realized multi-antigenic HA
261 expression of up to four HA subtypes within the same VLP.

262 • INFLUENZA GENE RATIOS

263 Achieving latter differs depending on the nature of used vector: relative multiplicity of
264 infection (MOI) will be used for transduction, where relative plasmid quantities will be used
265 for transfection. The MOI corresponds to the ratio of the number of infectious viral vectors
266 per cell (i.e. rBVs/cell) added to cell culture. A parallel could be made with μg of DNA applied
267 to the cell in transfected culture.

268 Also, three vector design strategies enable multiple gene expression : **co-infection (rBV)** or
269 **co-transfection (plasmid)** with multiple vectors, each one carrying a single influenza gene
270 (monocistronic), **co-expression** from a single vector carrying multiple genes (polycistronic) or
271 a combination of these two (see [62]). **FIGURE 2** describes, for the **62** listed publications using

272 cell culture-based processes, the number of influenza protein encoding genes integrated in
273 the vectors and the chosen expression strategies.

274 As clearly stated by **FIGURE 2**, transduction using co-expression with BEVS prevails among
275 studies compiled. Also, transduction studies privilege the use of co-expression. Pushko et al.
276 (2005) tried to produce VLPs by either co-infection and co-expression of HA, NA and M1 on
277 their first publication on the subject [21]. Yet, due to the high degree of cytopathology
278 associated with a high overall MOI (overall MOI=9), VLP production using co-infection led to
279 inconclusive results justifying their adoption of co-expression. Then a large number of
280 transduction studies followed their approach, which has the advantage to be less stringent in
281 terms of process parameters (unique rBV stock production and MOI evaluation). Overall MOIs
282 reported with BEVS-IC system are **medium-high** (MOI = 1 – 6), but until recently researchers
283 have not detailed design of experiments to support their choices. For example, in case of co-
284 infection, some studies reported MOI ratios of rBVs – HA:M1 = 4:2 [73] or 3:1 [74]. However,
285 recently, Monteiro et al. (2016) and Hu et al. (2017) tested various MOI respectively when
286 transducing Sf9 with HA-M1-rBV or co-infecting Sf9 with HA-, NA- and M1-rBV [75,76]. For
287 transduction, a MOI of 5 led to higher HA titers (ELISA) than lower MOIs (MOI=0.2 or 1), but
288 the authors declared that they could not obtain a clear correlation between MOIs and VLP
289 fold changes [75]. Regarding co-infection, a MOI of 2 for each rBV led to higher HA titers (HA
290 assay) than a MOI of 5 [76]. It probably underlines here again the restrictive character of overall
291 MOI when using co-infection. Yet it should be kept in mind that MOI determination and
292 comparison is still limited by the precision of the assay when evaluating cell density at
293 infection (cf section 2.2.2) and rBV titers (plaque assay, which remains the more precise and
294 more used test for rBV quantification, is also cell based and not standardized among
295 laboratories) [32,77].

296 Notably, for mammalian cell transduction, the highest protein expression was determined for
297 MOI = 60 using BV vector, while MVA vector offers rather classical MOI of 2 [46,47]. Low
298 transduction efficiency of BV in mammalian cells would then require more rBV amplification
299 steps with higher bioreactor volume than BEVS-IC for large-scale production.

300 But influenza gene ratios make even more sense in transfection strategy, where vectors are
301 not replicating and properly quantified. Despite this, no publication exploring flu-VLP
302 production depending on plasmid quantities or ratios has been listed. Thus, further work is

303 needed in order to build on initial developments that explored influenza protein expression
304 for various plasmid combinations [37,78]. Plasmid quantities are expressed in $\mu\text{g DNA}/\text{volume}$
305 or $\mu\text{g DNA}/10^6$ cells, while a rigorous unit should be a plasmid copy number/cell, which would
306 offer a way to compare with MOI.

307 **2.2.2. TIME OF INFECTION/CELL DENSITY AND TIME OF HARVEST**

308 An important parameter to evaluate in cell-based processes is the timing for infection or
309 transfection of the culture. Indeed, the time elapsed between the initiation of a culture and
310 the infection/transfection step will account for cell condition (cell physiological state, cellular
311 growth rate, death mechanism, cell history), but also for cell micro-environment, including
312 nutrients available for production and eventually toxic metabolites released [62,79]. Such
313 parameter is very well known in process development for virus and viral vector production
314 and is called **time of infection (TOI)**. TOI is commonly studied as a “cell density effect”,
315 described as a loss of viral particle productivity, when culture are infected/transfected at high
316 cell density in the exponential growth phase. This is why, in VLP studies, either for insect or
317 mammalian cells, infection or transfection were realized within the maximal growth phase at
318 relatively low cell concentration, typically **$1.0 - 2.0 \times 10^6$ cells/mL**, considering such cell lines
319 are commonly reported growing to cell densities above 10^7 cell/ml [21,40,63,65,75,80].
320 Sequeira et al. (2017) studied cell density effect occurring in insect cell culture during flu-VLP
321 production [29]. Sf9 transduction at **3.0×10^6 cells/mL** yield to lower cell productivity than **2.0**
322 **$\times 10^6$ cells/mL**. Thus, authors reported the development of a tailor-made refeed strategy (see
323 next section) that enable them to increase their cell concentration at infection up to **4.0×10^6**
324 **cells/mL** [29].

325 A second process parameter studied is the **time of harvest (TOH)**. Indeed, the production
326 phase should be long enough to ensure efficient protein expression, leading to VLPs budding
327 process (in the BEVS-IC system, polH and p10 late promoters governing protein expression are
328 activated only after 20-24 h.p.i [81] while influenza protein expression appears after 8-12 hpi
329 in mammalian cells [82]), but harvest should occur before accumulation of host-cell
330 contaminant in the culture broth. Indeed, after 3 days of culture, production process
331 commonly account for higher rates of cell lysis and protein degradation, and accumulation of
332 contaminants (host cell proteins, host cell DNA) which will have to be removed during
333 downstream processing [65,83]. Culture harvest is classically operated between 40 to 70%

334 viability and typical TOH are close to 72h post-infection for transduction, and 48-72h for
335 transfection studies.

336 **2.2.3. CULTURE MEDIUM/FEEDING STRATEGIES AND CULTURE** 337 **ADDITIVES**

338 Cell culture medium is known to strongly impact cell growth and could affect cell productivity,
339 product quality, and purification process. For VLP production on insect cell platforms, selected
340 media are mainly commercial serum-free media based on IPL-41 (Gibco SF-900™ II and III,
341 Hyclone™ SFX). Krammer et al. reported the use of IPL-41 and Grace's medium derived TNM-
342 FH supplemented with serum [22,23,35]. For production using mammalian cells, classical
343 MEM or DMEM media supplemented with serum are used for adherent cells whereas
344 commercial serum free medium (HyClone™ SFM4transFX293 or HyCell™ TransFx-H) is
345 preferred for HEK 293 suspension cell line [40,65,84]. The utilization of serum-free medium is
346 now acknowledged as essential for large-scale and future industrialization of production
347 processes, as serum containing media present extra risk of contamination and advantageous
348 because it avoids problems associated with animal-derived components, like higher
349 difficulties for downstream purification [83,85]. On the contrary, serum deprivation is often
350 known to reduce the cell productivity and alternative feeding strategies are developed.

351 Recent studies have sought to improve productivity of cell culture flu-VLP processes through
352 medium supplementation or/and feeding strategies. Monteiro et al. (2016) tested medium
353 supplementation for improving VLP yields in BEVS-IC [75]. They determine a 6-fold increase of
354 cell productivity of influenza VLPs by antioxidants and cholesterol boosting. This is consistent
355 with the involvement of cholesterol in influenza – and more generally, enveloped viruses –
356 budding process [61,75,86]. Also, sodium butyrate or valproic acid are used in mammalian
357 cell cultures to enhance protein expression [46,65]. From a global standpoint, Batch feeding
358 strategy is predominant over the other culture modes (i.e. Fed-Batch and perfusion modes)
359 for virus-like particles production [83]. Sequeira et al. (2017) initiated development of specific
360 feeding strategy for flu-VLP production and enabled a 4-fold increase of the HA titer reached
361 in their process by performing a single supplementation at 72 h.p.t (cocktail of protein/amino
362 acids, vitamin and lipids) [29]. Venereo-Sanchez et al. obtained a 3.4 increase of HA volumetric
363 titers (vs batch) by either discrete or continuous (i.e. with perfusion bioreactor) media

364 replacement [84]. Economical attractiveness of these alternative feeding strategies has yet to be
365 demonstrated at large-scale [33].

366 **2.3. PRODUCTION SCALE AND PROCESS AUTOMATATION**

367 For the major part of the studies, focus has been made on the structural analysis and
368 preclinical evaluation of immunological response of VLP lots injected to animal models.
369 Consequently, such studies only require small-scale productions with volumes rarely superior
370 to 200-300 mL and represent over 85% of published work. But recently, academic research
371 groups reached an advanced stage of process development with medium-scale flu-VLP
372 production in bioreactors. Five research articles reported bioreactor-level productions, mainly
373 to support upstream process optimization: Monteiro et al. (2016) scaled up to 0.5 L
374 bioreactors [75], both Pushko group (2016) and Sequeira et al. (2017) realized 2 L bioreactor
375 batches of multiple HA VLP [29,70,71] and Venereo-Sanchez et al. (2016) ran a 3L bioreactor
376 batch of influenza Gag-VLP [40,84]. One can also cite adherent mammalian cell cultures
377 operated with 3L spinner flask and microcarriers [38,39].

378 Two large-scale processes have been developed for now: one based on BEVS-IC platform
379 (Novavax, Inc. MD, USA) and one on Agrobacterium-mediated expression system in *Nicotiana*
380 plants (Medicago, Inc. QC, Canada) (see **TABLE 2**). Both reached late-stage clinical
381 development (phase III trial). Novavax even recently announced, at the end of 2016, the
382 approval of the first flu-VLP vaccine on the Indian market, the fruit of a joint venture with
383 Cadila pharmaceuticals Ltd (*Cadiflu*, CPL Biologicals Pvt. Ltd). They previously reported the use
384 of a 100 L wave-mixed bioreactor for Sf9 cells culture in 2009 phase II trial, and scaled-up to
385 1000 L disposable stirred bioreactor (Xcellerex, GE Healthcare) for the production of a GMP
386 batch in 2013 [13,87,88]. About plant-mediated expression system, the rapid scale-up showed
387 by Medicago – from the proof of concept of *in planta* flu-VLP production to the large-scale
388 production of 10 million doses of H1N1-VLP vaccine candidate in 2012 (BARDA contract) –
389 proved its high scalability [58].

390 Process automation is of interest when dealing with influenza vaccine manufacturing.
391 Redbiotec (Redbiotec AG, Switzerland) implemented a medium-scale process based on BEVS-
392 IC for co-expression in Sf9 cells by the use of a 10 L single-use wave-mixed bioreactor [63].
393 Their one-step inoculation of bioreactor by cryoconserved working cell bank grown at high cell

394 density lowers process length by omitting intermediate amplification of cell culture. Regarding
395 plant-based transient expression, fully automated and cGMP-compliant upstream process
396 lines have been developed by the Fraunhofer institute and Medicago to support their large-
397 scale processes [89]. Medicago also report the use of sterile soilless substrates and continuous
398 monitoring of plants to ensure reproducible biomass production [90]. These recent
399 developments offer the possibility for cell culture- and plant-based USP to be fully reactive in
400 case of a pandemic vaccine development and will support their ultimate growth at large scale.

401 **3. DOWSTREAM PROCESSES**

402 Upstream processes scale-up must be accompanied by the adoption of scalable purification
403 techniques, which differs from traditional laboratory methods. Downstream processes (DSP)
404 of flu-VLP must responds to multiple objectives which ultimately determine vaccine safety and
405 potency [33]. Firstly, particles released in extracellular medium needs to be separated from a
406 wide range of contaminants also presents in culture supernatant (i.e. cell debris, cellular
407 vesicles, BV and BV DNA, host-cell nucleic acids, host-cell proteins (HCP)...). Secondly,
408 downstream process must ensure a final quality product, in terms of activity and particle
409 integrity. The present section details the different purification schemes applied to flu-VLP
410 among the literature. Purification techniques and steps were mostly derived from traditional
411 purification processes applied to influenza and other enveloped viruses.

412 As reported previously, a large number of studies consist of small-scale batches, for which
413 laboratory methods are sufficient. The **FIGURE 3** illustrates the plurality of the DSP
414 methodological variants used for influenza VLP small- to medium scale batches purification,
415 and NOVAVAX's process at large-scale. Variability in laboratory DSP underlines the
416 preponderance of empirical approach for DSP design, while rational design approach has
417 potential to shorten DSP optimization [91]. Downstream process of plant-based VLPs, which
418 takes account for the platform's particularities, is detailed in **BOX1**.

419 **3.1. PRE-CLARIFICATION BULK TREATMENT**

420 Influenza VLPs are secreted in extracellular medium. Since their release, they can be subject
421 to physical degradation – which impacts efficacy of the final formulation – and aggregation
422 leading to lower recovery rates. A pre-treatment of culture medium is recommended before
423 clarification, with the addition of endonuclease (Benzonase®) or anti-proteolytic

424 preservatives, respectively to digest host-nucleic acids (to satisfy regulatory guidelines: see
425 section 3.5) and to avoid the extended degradation of the glycoproteins (more prompt to
426 occur in serum-free medium) [33,63,92].

427 In order to obtain higher recovery rates and maintain optimal antigenic conformation, the
428 evaluation of purification buffers and operation conditions, as well as the addition of
429 stabilizers is strategic for DSP steps efficiency. Kissmann et al. (2011) characterized physical
430 stability of H1N1-VLPs for various pH and temperature conditions and screened for
431 aggregation inhibitors [93]. Size heterogeneity between single VLP particles and aggregates
432 formed even at low temperature, depending on pH conditions, would influence DSP yields
433 (bulk storage at 4°C prior to depth filtration lead to decreased HA yields [94]). Novavax reports
434 adding NaCl to the medium at 0.5M to avoid VLP aggregation phenomenon during subsequent
435 clarification [95].

436 Another relevant concern is the consequence of the influenza HA antigen nature and specific
437 interaction with sialic receptor present on the cells membranes. Indeed, influenza VLP
438 released in culture supernatant would have an inherent affinity to host cell receptors. To avoid
439 either immediate binding of newly-formed VLP particles to producer cells or latter uptake by
440 surrounding cells, exogenous neuraminidase is frequently added during medium replacement
441 of mammalian cell cultures (from 6.25 mU/mL [48] to 2 U/mL [47]). Some authors reported
442 NA adjunction exclusively in absence of NA expression [52], while others systematically used
443 it. Interestingly, Thompson et al. (2015) did not observe noticeable effect of NA treatment on
444 VLP release from cell pellet, while HA assay and NSTEM analyses reveal the presence of active
445 HA and influenza-VLP in cell pellet washed with trypsin [65]. These results indicate that, for
446 production in mammalian cell system, an extraction step prior to harvest should allow to
447 increase the final VLP recovery yield.

448 **3.2. CLARIFICATION**

449 Clarification should ensure removal of cells, cell debris and large aggregates from culture
450 supernatant, while preserving VLP integrity. Standard reference for clarification is low speed
451 centrifugation (**FIGURE 3**). This method is convenient from small- to medium-scale production,
452 with the use of widespread conventional centrifuges. Interestingly, applied centrifugal force
453 and time of centrifugation vary from 300 g – 5 min [65] to 10,000 g – 1h [21]. Nevertheless, as

454 for ultracentrifugation (see below), the real impact of such factors on VLP titers and medium-
455 density contaminant levels has not yet been explored.

456 Membrane processes emerged as a reliable alternative to centrifugation – particularly for
457 large volume productions – because of their increased scalability and higher control of shear
458 stress compared to centrifugation methods [92]. Normal-flow filtration (NFF, or dead-end
459 filtration) and tangential-flow filtration (TFF, or cross-flow filtration) with micrometer scale
460 cut-off filters can be used. These two types of filtration can be both performed by using
461 surface or depth filters (see **TABLE 2**). Depth filters can advantageously absorb HCP and DNA
462 depending of the filter’s material and its dimensional arrangement [33,92].

463 Academics reported the use of NFF sterile microfiltration (e.g. 0.2 μm) for bulk clarification of
464 flu-VLP bioreactor batches [29,40,71]. Redbiotec implemented disposable depth filters in their
465 DSP for clarification of their batch and obtained 90% recovery yields (based on HA assay) [63].
466 For NFF, a filter train with decreasing pore size can be set up and optimized to limit clogging
467 phenomenon and achieve higher VLP recovery, as for Xenopoulos et al. (2015) which obtained
468 100% recovery of enveloped HCV-VLP when they passes culture medium trough 5 and 0.3 μm
469 depth filters (versus 52% when centrifuging at 300xg and passing through 0,3 μm filter) [96].

470 Tangential flow filtration can couple clarification and purification steps, as this method
471 simultaneously allows for large debris removal, VLP concentration and medium exchange by
472 diafiltration (cf **FIGURE 3**). When working with TFF, shear force and trans-membrane pressure
473 (TMP) can be monitored and optimized to achieve lower cell lysis and higher VLP recovery
474 during clarification, as Negrete et al. (2014) did in their process while working with enveloped
475 HIV-VLP [97].

476 **3.3. CONCENTRATION AND PURIFICATION**

477 **3.3.1. ULTRACENTRIFUGATION (UC)**

478 Ultracentrifugation is a traditional and established method for virus purification at laboratory
479 scale (here performed in batch mode). It has been since long time employed for concentrating
480 and purifying viral particles in a single unit operation by treating culture supernatant through
481 either simple cushion or gradient of various reagents (i.e. sucrose, cesium chloride or
482 iodixanol) [98]. Viral particles are sorted from bulk components by differences of density. This
483 standard use for virus explains why ultracentrifugation has also been adopted for influenza

484 VLP purification and remains predominant over other methods at laboratory scale. Usual
485 ultracentrifugation-based purification involves most of the time two consecutive UC: a first
486 one mainly oriented to product concentration, and a second one with an increased separation
487 potential mostly using density gradients.

488 Ultracentrifugation can offer good volumetric concentration factors (VCF) (see **TABLE 2**).
489 Thompson et al. (2015) raised the question of the impact of UC process – particularly simple
490 UC that pellets VLP – on such fragile material [65]. Despite the absence of evaluation on flu-
491 VLP, it has been shown that sucrose UC induces alterations of the membrane of influenza
492 virions that could be attributed to both physical and osmotic stress [67,99]. Physical
493 degradation lead to decrease in either product yields and/or potency by the loss of structural
494 conformation and increase of contaminants [65]. Iodixanol (Optiprep™) is thus best suited for
495 VLP purification because it offers isotonic gradients with higher separation efficiency than
496 sucrose-based gradients. Several authors underlined that iodixanol gradients can perform
497 separation with good resolution between enveloped virus/VLP and extracellular vesicles [100–
498 102].

499 **3.3.2. MEMBRANE FILTRATION**

500 As for clarification, filtration also offers a scalable alternative to traditional UC with tangential-
501 flow filtration (TFF). TFF with sub-micrometer pore size offered high recovery yields regarding
502 the purification of a wide variety of VLPs, and influenza virus [94,97,98,103,104]. TFF can be
503 implemented as the first purification step, optionally coupled with low-speed centrifugation
504 or with prior microfiltration for clarification (cf **FIGURE 3**). Contrary to clarification, VLPs here
505 remain in the retentate while smaller contaminants pass through the membrane.

506 Using membranes or hollow fibers, several processes applied TFF for influenza-VLP
507 purification and concentration with various pore size. Nominal molecular weight cut-off
508 (NMWC) of filter is determined by using globular proteins or dextran markers and given on a
509 molecular weight basis [92]. Then, the best way to a proper determination of optimal NMWC
510 for purification of VLPs – with their singular macromolecular structure – still resides in design
511 of experiments [92]. Industrials and academics employed 300kDa [74,105,106] or 500kDa cut-
512 off [71,107] for flu-VLP DSP processes. Also, Venereo-Sanchez et al. (2016) obtained a 45%
513 recovery of total HA from influenza VLPs while using a 1000 kDa membrane (based on Dot-

514 Blot quantification) [40]. This recovery factor seems low when compared to quasi-total (>90%)
515 recovery attained by TFF for other enveloped VLPs or influenza virus [94,98,108,109]. Then,
516 apparent losses in the process could either be attributed to HA conformation losses, fouling
517 losses at filter surface, losses of HA non-integrated in viral particles, or a combination of these
518 factors.

519 Membrane-based small- and medium-scale alternatives to ultracentrifugation are also
520 offered. Low-volume centrifugal filtration units can be processed in traditional centrifuge. J-K
521 Park et al. (2013) reported VLP concentration from 2^7 to 2^{10} HAU with 100 kDa MWCO units
522 [110]. Recently, YC Park et al. (2017) reported the use of a medium-scale stirred cell device
523 with 100 kDa MWCO membrane under N₂ pressure, also offering a 2^3 HAU gain with 10 VCF
524 and 80% recovery of total HA [111].

525 **3.3.3. CHROMATOGRAPHY**

526 Chromatography allows for purification of VLP using other physicochemical characteristics
527 than the previous techniques (i.e. size or density). This method offers a flexible design through
528 the choice of the stationary phase (i.e. bead-, monolith- or membrane-based), the selection
529 of surface chemistry and the mode of operation [98].

530 Regarding the stationary phase, monolithic matrices possess several advantages over
531 traditional bead-based resins when working with relatively large and fragile nanoparticles (i.e.
532 enveloped VLPs or viruses, which sizes between 50-200nm, when flu-VLP are 100-120nm)
533 because they combine micrometer-scale channels, high dynamic binding capacity and low
534 pressure drop [91,112]. Membrane-based chromatography also revealed advantageous for
535 the purification of viral particles [113].

536 Chromatography matrices surface chemistry will enable to separate flu-VLP based on either
537 their isoelectric point (Ion-exchange chromatography: IEX) or affinity toward specific ligands.
538 Various methods have been developed, based on IEX and affinity chromatography (using
539 fetuin protein harboring sialylated glycans [11]). The successful applications of IEX to rBV and
540 influenza virus purification made it suitable for influenza VLP [32,91,114]. Medicago's process
541 use several chromatographic steps (detailed in **BOX1**) and underlined the higher scalability of
542 IEX compared to affinity chromatography. IEX conditions can be adjusted to allow work either
543 in classical bind-elute mode ([91,114,115]) or flow-through mode. This last mode offers a

544 selective binding of BV and nucleic acids in the column while VLPs stay in the mobile phase,
545 with 42% recovery (based on HA quantification by SRID) in the pilot scale (for 400-600 mL
546 sample volume [116]). NOVAVAX also reported use of anion exchange chromatography for
547 VLP separation from baculoviruses and other host contaminants (**FIGURE 3**) [88]. Despite this,
548 due to the structural nature of BV particles, close to influenza VLPs (both are enveloped
549 viruses), and their high expression in BEVS-IC, it remains difficult to efficiently separate these
550 contaminants from VLPs, even by having recourse to chromatographic methods [24,65].
551 However, works based on rational development tools to efficiently model VLP purification
552 [101,115,118], and progress made regarding IEX-based separation of HIV-1 VLP from
553 extracellular vesicles [101,117] showed there is still room for improvement of
554 chromatography-based flu-VLP downstream process.

555

556 **3.4. POLISHING**

557 Polishing ensures that final formulation responds to quality criteria (see **section 3.5**) by an
558 extensive removal of the remaining contaminants. Chromatographic processes are thus
559 particularly suited because they allow high resolution separation between bionanoparticles
560 and other impurities as DNA and HCP [91]. Venerao-sanchez et al. evaluated HCP and HC DNA
561 removal capacity of TFF polishing step in their process, as did large-scale processes [40].
562 NOVAVAX's response to residual BV contamination has been to include an inactivation step of
563 baculoviruses with use of beta-propiolactone after ion exchange chromatography (cf **FIGURE**
564 **3**). Their polishing sequence then consists in size-exclusion chromatography, a classical
565 polishing step that allows for buffer exchange (as does TFF used in Medicago's polishing :
566 **BOX1**) and which has also proven potential for BV separation that could further minimize
567 residual BVs [120].

568 A final 0.2 µm filtration step is generally used for ensuring sterility of biopharmaceutical
569 formulation, but due to the relatively large size of enveloped VLP, this step can result in
570 substantial product losses from membrane adsorption and shear stress [33,121]. Redbiotec
571 are currently implementing single-use and fully aseptic DSP approach in their VLP processes
572 that circumvent the use of sterile filtration [109].

573 **3.5. VACCINE FORMULATION/QUALITY CONTROL**

574 The main criterion for influenza vaccine being an HA content of 15µg/strain/0,5 mL dose
575 volume because it usually corresponds to the amount required for ovoculture-produced
576 influenza vaccine to properly fill the immunological criteria. Host cell DNA, host cell protein
577 (HCP) must respond to quality requirements for vaccine manufacturing [33,122,123]. Quality
578 monitoring also includes sterility testing, summary of vaccine composition, determination of
579 residual chemicals, purity assessment of protein content and evaluation of endotoxin content
580 [92,121,123,124]. Despite their apparent lack of human pathogenicity, residual baculoviruses
581 level should also be “as low as possible” [33]. **TABLE 3** resume the criteria for influenza vaccine
582 manufacturing applied to flu-VLP.

583 Formulation should maintain vaccine stability until the final product use by an adjustment of
584 stabilizers, pH and storage temperature conditions [93,125]. By nature, enveloped vaccine (as
585 flu-VLP or inactivated influenza vaccine) are inherently less stable than TIV or subunit ones,
586 and either stabilizers or adjuvants can be used to maintain the required potency [125].
587 Kissman et al. (2011) identified sugars (trehalose), polyols (sorbitol) and amino-acids (glycine)
588 as physical stabilizers of flu-VLP [93]. Also, several studies and trials reported the evaluation
589 of adjuvanted influenza VLP vaccines and obtained enhanced immune responses with the use
590 of various adjuvants [74,76,126–130]. Novavax obtained a stable HA potency of their trivalent
591 VLP vaccine over the course of a 12 month stability study, and tested their VLP formulations
592 with the addition of saponin-based adjuvant [119,131].

593 **4. THE PRESENT AND FUTURE OF INFLUENZA VLP BIOPROCESSES:** 594 **IMPLEMENTING RATIONAL DEVELOPMENT IN PROCESSES TO SUPPORT** 595 **NEW IMMUNOLOGICAL STRATEGIES**

596 The advantage of flu-VLP, when compared to recombinant hemagglutinin vaccination
597 strategy, resides in their repetitive macromolecular structure which will promote immune
598 response in a similar manner as native influenza virus. But, unlike the production of influenza
599 virus by infection in ovoculture, VLP production offers many degrees of freedom to modulate
600 antigenic presentation. As rational design is promoted for empowering vaccine bioprocesses
601 development, researchers and manufacturers now dispose of a sufficient number of tools to
602 overpass the classic protein approach and implement new strategies for enhancing vaccine
603 immune response in flu-VLP processes [91,132,133].

604 **4.1. TAKING ACCOUNT OF THE GLYCOSYLATION OF VIRAL ANTIGENS**

605 Whereas it appears essential to closely match the mammalian glycosylation pattern for
606 recombinant biotherapies and thus minimize reactogenicity problems, a balance can be made
607 for vaccine strategy where the adjuvant effect of non-mammalian glycan motifs/peptides will
608 benefit to vaccine efficiency (then minimize resorting to other vaccine adjuvants).

609 The specific glycosylation pathway of each cell platform is particularly relevant about the
610 vaccine strategy, because both HA and NA antigens are glycoproteins and thus undergo an N-
611 glycosylation process during their expression [38,44,134,135]. Thus, firstly, variations in
612 glycosylation profile will impact particle aggregation [136]. Secondly, size and nature of
613 glycans linked to HA and NA greatly impact the intensity and breadth of the immune response
614 [132,137–141]. **FIGURE 4** shows the expected variations in glycosylation profile for H5 and N1
615 glycoproteins expressed in four different cell platforms (hen's egg, *N. benthamiana* plant,
616 insect HighFive cells and HEK293 mammalian cells) according to data derived from glycomic
617 analysis [135,142].

618 Glycoengineering toolbox expanded in recent years, offering the possibility to produce
619 mammalianized antigens in either plant or insect cells by the use of glyco-modules in vectors
620 or cell engineering [30,143,144]. This strategy can be used to modulate immune response of
621 vaccine antigens toward conserved epitopes by the production of VLP harboring antigens with
622 tailor-made glycoforms that broad steric hindrance toward immune-dominant sites [145].

623 Also, the density of viral antigens at the surface of the VLP will impact avidity between the VLP
624 and immune cells and thus impact immune response [137]. It appeared that HA induces higher
625 humoral response when displayed at lower surface densities on the surface of nanoparticles
626 [146]. The incorporation of membrane or matrix proteins from other viruses (i.e. HIV Gag) and
627 the modulation of antigen glycosylation profile both play on antigen (i.e. HA/NA) density at
628 VLP surface and could then be used to modulate antigen presentation.

629 **4.2. ADDRESSING THE PRESENCE OF NON-INFLUENZA-DERIVED PROTEINS** 630 **IN FLU-VLP VACCINES**

631 Non-viral proteins (i.e. HCP or proteins present in culture medium) can be present in various
632 forms in cell culture derived bioproducts. While free proteins can be easily separated from
633 large VLP particles during DSP, the separation of the two other forms of host-cell derived
634 proteins (i.e. exosomes-embedded and VLP-embedded proteins) constitutes a critical

635 bottleneck for DSP.

636 A comparative study between insect and mammalian cell platforms used HEK 293 SF-3F6 and
637 Sf9 cells respectively for transduction with Bacmam and BV [65]. Authors conclude that
638 transduction of Sf9 cells led to VLP production levels 35 times higher than HEK 293 cells (based
639 on NSTEM quantitative evaluation; evaluation of HA protein content by SRID gave a ratio of 4:
640 see **TABLE 2**). The authors also reported a better conformation of the VLPs issued from BEVS-
641 IC (i.e. homogeneity of size and morphology, probably linked to a better incorporation of M1
642 – see section), but with 20 times more BV than VLPs. However, a high production of vesicles
643 was also reported in HEK 293 cells batches.

644 Mass spectrometry analyses recently enlighten the fact that flu-VLP, like influenza virus,
645 incorporate a large variety of host cell proteins [38,106,147,148]. These are either membrane
646 or cytoplasmic proteins incorporated in the VLP during the budding process that occurs
647 similarly on all platforms. Unlike for rHA vaccines, these sets of platform-dependent
648 embedded proteins cannot be sorted out during DSP and should be considered for their
649 potential immunogenicity/reactogenicity during vaccine evaluation.

650 According to the European Pharmacopoeia, the threshold value for residual proteins is 40 µg
651 of protein other than hemagglutinin per virus strain and per vaccine dose [123]. For purity
652 assessment of VLP vaccine lots, flu-VLP manufacturers tested their formulation for quality
653 requirements [90,119]. NOVAVAX (by SDS-PAGE, WB and LC/MS) showed that baculovirus
654 envelope proteins (e.g., gp64, p39) and Sf9 host cells proteins (e.g., tubulin, actin, Hsp70 and
655 several housekeeping proteins) could take part for up to 25% of total protein content [119].
656 This is higher than results obtained for the plant-based production (see **BOX1**). A part of these
657 proteins inherently included in influenza VLP, which could be non-negligible according to the
658 used cell platform, must be then be considered [17,149]. Also, proper analytical techniques,
659 taking account of the particular embedded nature of antigens and proteins, are there again
660 needed to empower quantitative and qualitative evaluation of the final product.

661 **5. EXPERT COMMENTARY**

662 Since about fifteen years, concept-proof and immunological studies proved the reliability or
663 flu-VLP strategy and its advantages over traditional ovoculture. The diversity of expression
664 platforms that flu-VLP can be produced in, added to their versatility (flu-VLP have already been

665 produced with a large variety of influenza strains and a wide range of combinations: see
666 **supplementary TABLES 1 and 2**) make of them a robust and powerful tool for influenza
667 vaccine development. The fact that last two years have seen the emergence of flu-VLP
668 bioprocess publications by academic community illustrates the maturity of that field and last
669 clinical developments of flu-VLP made the integration of enveloped virus-like particles in the
670 field of vaccinology now fully effective. This also portrays the recent evolutions of that field
671 led by adoption of new immunological paradigms (see **BOX 1**) supported by the development
672 of powerful analytical tools.

673 Because of the vaccine formulation is based on immunological criteria, a balance must be
674 made between detailed process parameters – like mass or volumetric productivity in the
675 chosen platform or manufacturing duration – and immunological relevance and efficiency of
676 formulated vaccine.

677 **FIVE YEAR VIEW:**

678 Forthcoming years will very probably result in major steps for both manufacturers and
679 academic influenza VLP community.

680 Regarding manufacturers, next five years will very likely see the launch of other flu-VLP
681 vaccines. Medicago's plant-based VLP are now achieving late-stage clinical phase
682 development (phase III trial). The plant-based process has many assets to seriously
683 concurrence the ovoculture process. Other manufacturers are in the running, as Medigen
684 (Medigen, Inc, USA). The capability for influenza VLP vaccine manufacturers to scale-up their
685 USP/DSP in a cost-effective way will determine their future share in a global influenza vaccine
686 market that is estimated to grow to nearly 6 billion USD by 2022.

687 Influenza VLP reveals being a strategy of choice when working with avian strains for zoonotic
688 or pre-pandemic vaccine development, as showed by the high proportion of H5N1- and H7N9-
689 derived viral proteins within compiled studies (see **supplementary TABLE 1**). Clinical and
690 stability studies will provide further insights regarding cost-effectiveness of avian influenza
691 VLP vaccines for either human vaccine stockpiling and veterinary market supply.

692 Obtained results among a variety of platforms and functional versatility of influenza VLP
693 strategy are promising features for future process development, as illustrated by the recent
694 example of an innovative approach where rBV is directly inoculated in silkworm pupae, leading

695 to high scale HA-VLP production [153]. We here underlined many aspects that make both USP
696 and DSP development of influenza VLP complex. But process inherent complexity is not the
697 only limitation. Indeed, as for other VLPs, flu-VLP process design and evaluation also rely on
698 availability of reliable – and potentially in-process – analytical methods for a proper
699 quantification of vectors (discussed here above) and mostly influenza VLP (reviewed in [154]).

700 **Financial & competing interests disclosure**

701 *This work was supported by project grant FP7-PEOPLE-2013-IIF/624939. L. Durous*
702 *acknowledges the Auvergne Rhône-Alpes Region for his PhD grant (ARC 1 Santé). The authors*
703 *have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with*
704 *a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the*
705 *manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of*
706 *this manuscript.*

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721 **FIGURE LEGENDS:**

722 **FIGURE 1:** Overview of the systems developed for influenza VLP production.* VLPs accumulate within
723 space between plant cell walls, requiring advanced purification process for their recovery from plant
724 slurry (also including host cell-derived membrane-bound vesicles [66]) ** influenza proteins can be
725 incorporated in the surface of neo-formed baculoviruses during budding process when both are
726 expressed in insect cells; *** HEK 293 system produces a large range of vesicles partially co-purified
727 with VLPs, potentially also incorporating HA and/or NA [65]. Insect cell stable transfection and MVA-
728 based mammalian cell transduction are not here represented [28,47].

729 **FIGURE 2:** Expression strategies among listed studies (excluding the plant-based system). Number of
730 vectors constructs takes account for the multiple vectors in publications comparing different
731 expression strategies or different combinations of proteins. Each bar is subdivided proportionally to
732 the number of expressed proteins (joined in white). * Vector constructs realized for transduction of
733 mammalian cells are not reported in the graph (excluding 1/53 publication from Schmeisser et al. [47],
734 see supplementary material); ** 4 or more: Pushko group produced VLPs with multiple HA expression,
735 using rBV carrying up to 6 genes. Some studies also reported use of combination of approaches, for
736 example with co-infection of BV co-expressing HA-NA with another expressing M1 (not detailed here,
737 see **Supplementary Table 2**). Details for proteins expressed in vector constructs are available in
738 **Supplementary Table 2**.

739 **FIGURE 3:** Downstream processes for influenza VLP purification among listed studies. **Textbox**
740 **background color:** white = centrifugation-based methods, gray = membrane-based methods, black =
741 chromatographic methods; **CF:** Centrifugal Filtration; **Dialy.:** Dialysis, used for medium exchange; **IEX:**
742 Ion-Exchange Chromatography; **Iodix. UC:** Iodixanol gradient UC; **LSC:** Low Speed Centrifugation; **SEC:**
743 Size-exclusion Chromatography; **SMF:** Sterile microfiltration; **TFF:** Tangential Flow Filtration; **UC:**
744 Ultracentrifugation; **SC-UC:** Sucrose Cushion UC; **SG/DSG-UC:** Sucrose Gradient or Discontinuous
745 Sucrose gradient UC. For small-scale productions using membrane processes for clarification (CF/TFF),
746 prior clarification of large debris can be realized by sterile microfiltration (0.2/0.45 µm) or low-speed
747 centrifugation. For NOVAVAX large-scale process, TFF assemblies realize clarification, concentration
748 and diafiltration in a single step, and residual BV inactivation is realized by 0.2% β-propiolactone [13].

749

750

751

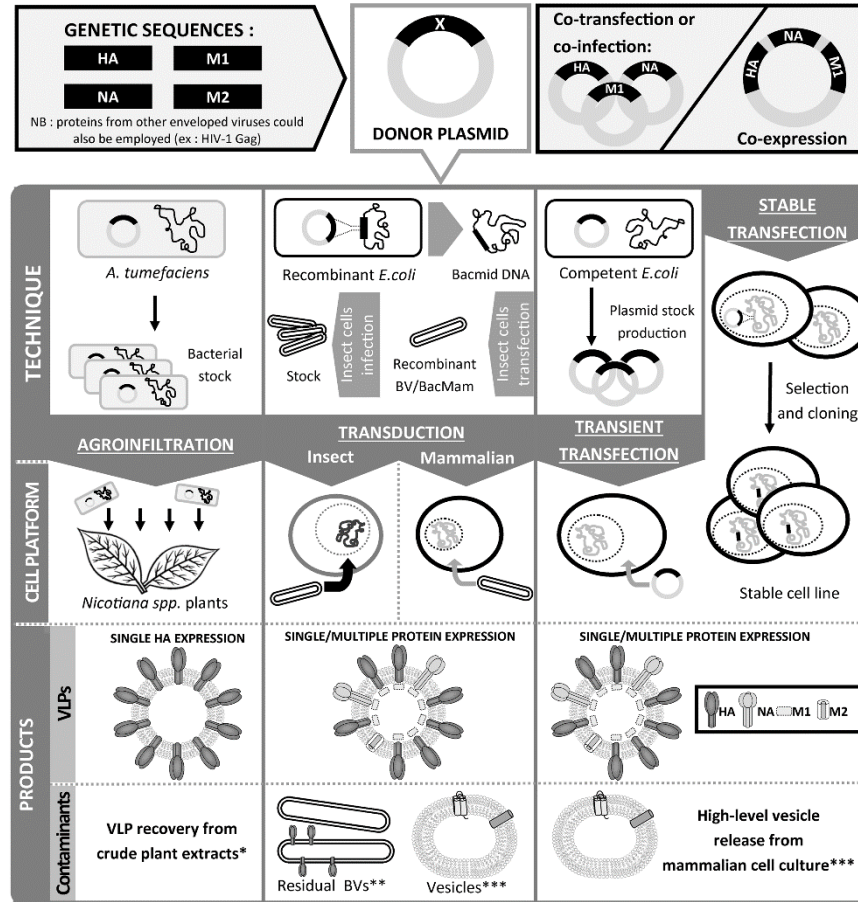
752

753

1

2

FIGURE 1



3

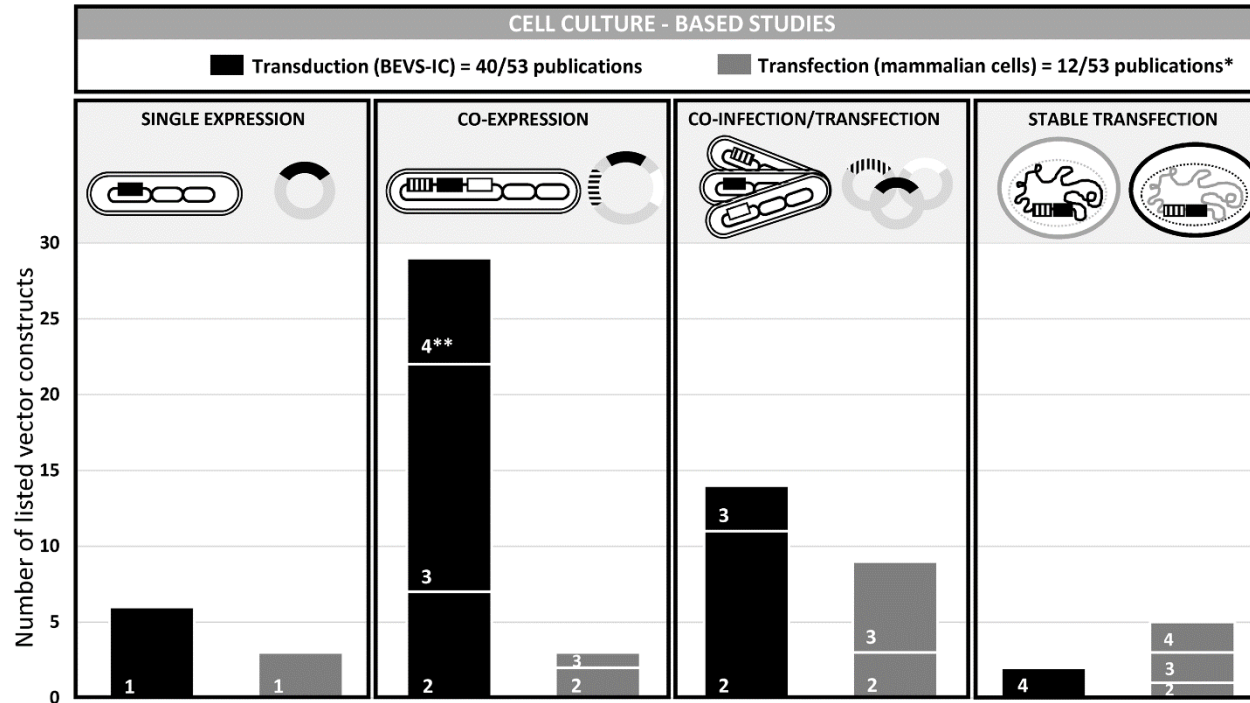
4

5

6

7
8
9
10

FIGURE 2:

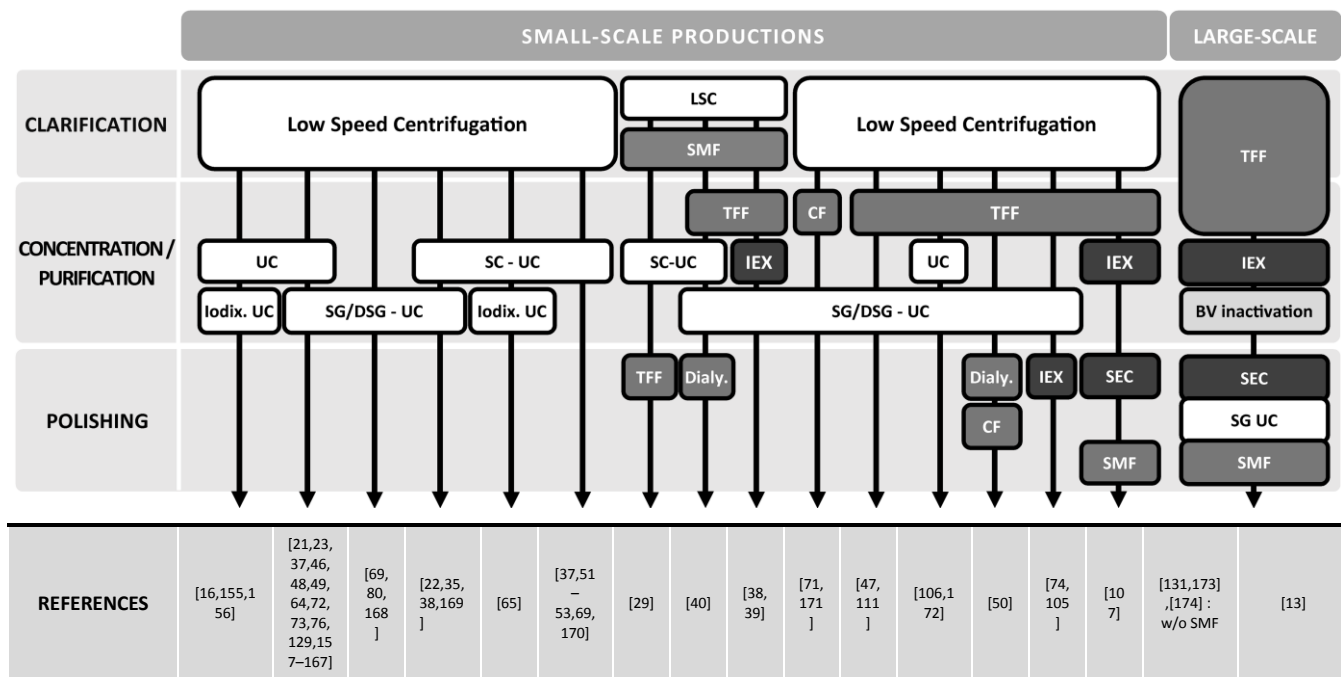


11
12
13
14
15

16
17
18
19

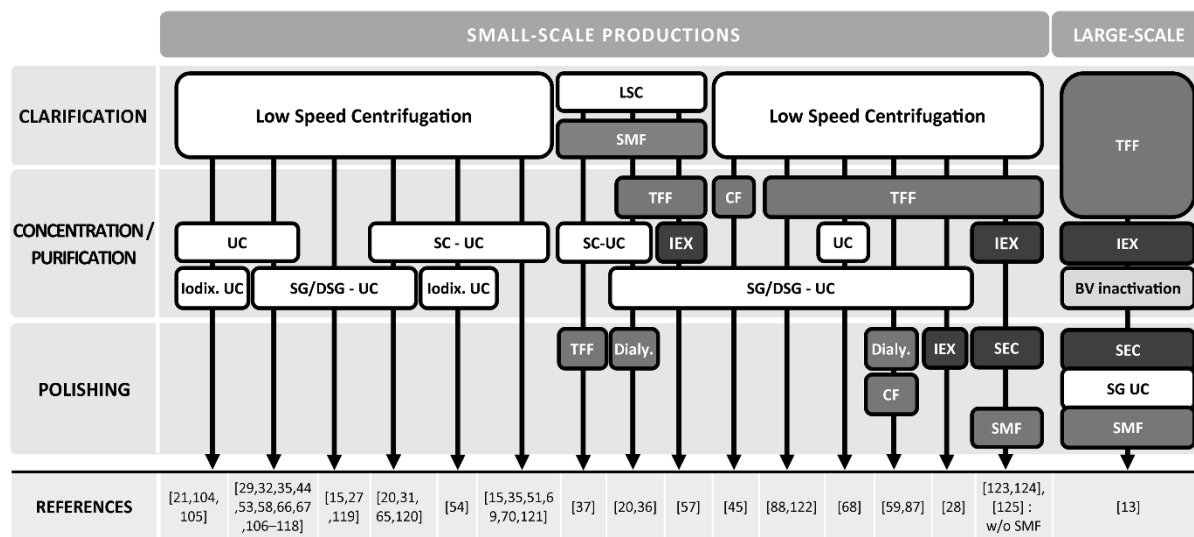
20
21
22
23
24
25
26
27
28

FIGURE 3 (w/o included sources for bibliography):



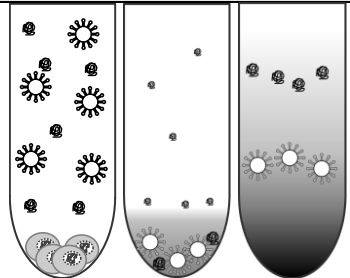
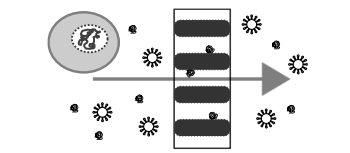
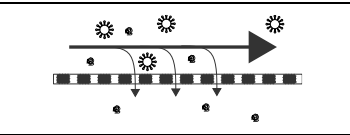
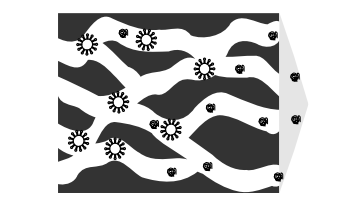
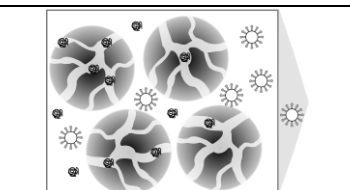
29
30
31
32
33

FIGURE 3:



34
35
36
37

38 **TABLE 2:** Comparative evaluation of separation units used for flu-VLP downstream processes. **A:** 1) Simple centrifugation for clarification, 2) Cushion UC, 3)
39 Gradient UC; **B:** Normal-flow filtration (NFF) with depth filter; **C:** Tangential-flow filtration with membrane filter; Chromatography-based separation with a
40 monolith matrix in bind-elute mode (**D**) or by size exclusion based on porous polymer-based (e.g. Dextran) bead resins (**E**). * Depth filtration also perform
41 separation according to charge ** Medium exchange can be performed when resuspending pelleted material after simple UC/cushion UC; *** For affinity-
42 based chromatography

	Separation Unit	Subtype	Separation criterion	Scalability	Medium exchange	VCF	Single Use / Disposable	Advantages	Inconvenient
CENTRIFUGATION		Rate-zonal	Density	+	Yes/No**	50-100 [65]	No	High separation resolution Straightforward process	Stress (physical + osmotic) Not continuous Cumbersome
FILTRATION		NFF	Size*	+++	No	1	Yes	Straightforward process Inexpensive	Not continuous (filter clogging) Low separation resolution
		TFF			Yes	10 [111]	Yes	High-throughput Continuous Linear scalability	Filter adsorption Low separation resolution
CHROMATOGRAPHY		IEX	Charge	++	Yes	1 -	Yes	High-throughput Continuous High separation resolution	Stationary phases cost*** Not straightforward
		Affinity-based	Affinity toward ligand		Yes		No		
		Gel filtration	Size	++	No	< 1	Yes	Low physical stress	Low throughput Reduced scalability Not continuous

43

44

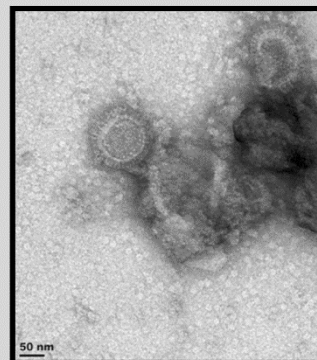
45 **TABLE 3:** Criteria for quantitative evaluation of antigen content and quality control of flu-VLP vaccine. This table is based on data for licensure of traditional
 46 influenza vaccines by European regulatory authorities [121,123,175]. * Extensive reviews of available analytical techniques for flu-VLP processes evaluation
 47 can be found elsewhere [152,154] ** Single Radial ImmunoDiffusion (SRID) assay remain the only potency test for influenza vaccine that is validated by the
 48 EMA/FDA [154] *** Endotoxin content evaluation is particularly suited when bacterial vector is used as in plant-based VLP **** No official recommendation
 49 regarding the level of residual BV in vaccine formulation has been found, based on Novavax clinical lot release testing [119]

Quality attribute	Quantitative /Qualitative assay		Target	Specifications	Method*
	X				
Antigen	X		HA NA	• 15µg HA/strain/0,5 mL**	SRID** [EP 2.7.1], HA assay, Dot-Blot, SPR
		X	HA NA	• Antigen presence/activity	SRID** [EP 2.7.1], SDS-PAGE, Western Blot/HA assay, Enzymatic NA activity assay
Total proteins	X		Viral proteins, HCPs	• < 40 µg non-HA protein/strain/0,5 mL	Total protein quantification assay (Bradford, BCA)
		X		• Host cell protein profile evaluation • Vector-derived proteins evaluation	SDS-PAGE, Western Blot, ELISA, LC-MS
Total particles	X		VLP, Extracellular vesicles, BV	• Flu-VLP titer evaluation • Residual BV/extracellular vesicles titer	TRPS, Virus Counter, Analytical Chromatography, ES-DMA, AF4-MALS
		X		• Particle morphology (structure, mean diameter) monodispersity, aggregates presence	DLS, NSTEM, ES-DMA, AF4-MALS
DNA content	X		HC DNA, Vector DNA (ex : BV DNA)	• <10 [ng/dose] • Fragments <200 bp	Spectrophotometry Electrophoresis
Endotoxins content	X		Endotoxin	• < 25-100 [IU/dose] ***	Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) assay [EP 2.6.14]
Residual chemicals	X		B-propiolactone, Formaldehyde	• <10 ppm • < 0.2 [g/L]	NMR, Chromatography Colorimetric [EP 2.4.18], Chromatography
Residual infectious BV	X		rBVs	• Absence of residual infectious BV****	Plaque assay, qPCR, TRPS, Flux Cytometry + DNA labelling
pH		X	pH	• 6.5-7.3	Potentiometry [EP 2.2.3]
Sterility		X	Bacterial/viral contaminants	• Absence of bacterial/viral contaminants	Sterility test [EP 2.6.1]

50
51
52

BOX 1: DSP of influenza VLPs produced in Plant-based system

Agroinfiltration in *Nicotiana* plants induce VLP budding in apoplastic space between plant cell wall and plasma membrane [48]. Number of studies reported expression of rHA in plant systems, but evidence of HA assembling in VLP structures was brought by Medicago research group [47]. VLP extraction must then differ from plant rHA extraction in order to retain VLP structural conformation. Recently, Rybicki et al. (2014) also obtained observations of VLPs (cf picture, [126]) extracted by gentle centrifugation of buffer-infiltrated leaves cut into strips. First non-laboratorial DSP scheme described by Medicago consisted of a large sequence : plant homogenization and 400 μ m filtration, separation of insolubles by heating and centrifugation, microfiltration and TFF of soluble fraction, multiple IEX and fetuin-based affinity chromatography steps followed by second TFF and sterile filtration (under cGMP regulations [127]). Then they refine their approach by using enzyme-assisted pretreatment in order to release VLPs from the extracellular matrix by cell wall depolymerization, thus avoiding unwanted cell disruption [128]. This improvement allowed for process simplification and scalability gain with removal of the affinity chromatography step, while increasing product



TEM observation of H5N1 VLPs expressed by agroinfiltration. Issued from [126]

yields and purity (release of more than 90% of HA-VLP and less than 5% HCP/HC DNA at extraction step, 98-99% HA purity on final preparation evaluated by SDS-PAGE/WB with DNA and endotoxin levels below than limits) [100,128]. Yet, downstream process of plant-made influenza VLPs still remains more tedious than for the other detailed platforms, lowering the detailed advantages of agroinfiltration in terms of USP (nb: with recent USP developments based on transient expression system, DSP costs represent >80% of total cost of plant derived VLPs [55]). Thought, Medicago process developments made use of agroinfiltration platform quickly feasible for influenza VLP large-scale manufacturing.

55 **TABLE 1:** Process and clinical development of influenza VLP strategies comparing to traditional egg-based process (NB: other strategies obtain lower process
56 length than ovoculture, like FluBlok® rHA process in less than 6 weeks [179]). Given yields correspond to few available bulk yields (without purification) and
57 may not reflect average values. Ovoculture production yield : data derived from our laboratory vaccine process;* For Pandemic/HPAI strains vaccine [5]; **
58 Global production of inactivated trivalent vaccine for 11/12 season accorded to [180] ;*** Medicago recently unveil the project of a new facility with a capacity
59 of 40-50 million seasonal doses [181]; † See [182] for details; †† Both insect and plant-derived vaccine tested in clinical trial gave similar reactogenicity than
60 conventional inactivated vaccine [13,14]. Concerning antigen glycosylation impact on immunogenicity, one cell platform could suits preferentially over another
61 depending on the chosen vaccine strategy (insect cells HA with smaller glycans seems to be more suitable for inducing broad immune responses, while hyper
62 glycosylated HA from mammalian cells might be the more suitable for inducing an immune response against conserved HA stalk domain : see [5]).

63

		Infection	Plant cell agroinfiltration	Transduction		Mammalian cell transfection
		Ovoculture		BEVS	BacMam	
PROCESS	Production yields (HA)	1-3 µg HA/mL (10-45 µg HA/egg)	45 mg/kg of leaves[58]	0.4-15 µg/mL [23,63,65]	~0.1 µg/mL [65]	0.4-1.2 µg/mL [38,40,84]
	Scalability	1-2 egg/vaccine dose	2 kg leaves/m ² /6 weeks	Low- to high-volume bioreactors		
	BSL-3 facilities need	Yes*	No	No	No	No
	Flexibility	Not flexible	Flexible	Highly flexible	Highly flexible	Highly flexible
	Process length	20-24 weeks[5,44]	3 weeks[59]	10-12 weeks[44,87]	-	16 weeks[40]
	Attained production scale	~600 M doses /year (global production)**	> 10 M doses/30 days (facility production)***	25 million doses/year (facility capacity) 1000 L Bioreactor ***	Laboratory Shake flask (<1L)	Laboratory 3 L Bioreactor
CLINICAL	Clinical development	Several licensed vaccines	Phase II trials †: <ul style="list-style-type: none"> • monovalent [11,177,183] • quadrivalent[14] Phase III multicentric	Phase II trials: <ul style="list-style-type: none"> • monovalent [12] • quadrivalent [184] Phase III multicentric	Preclinical	Preclinical
	N-glycosylation of antigens	Egg-derived N-glycans††	Plant-specific N-glycans††	Insect-specific N-glycans††	Mammalian glycosylation††	Mammalian glycosylation††

64

65

66 **Supplementary Table 1:** Influenza strains and proteins used for flu-VLP production.

Host	Strain Specs.	Strain Subtype	H5 Clade	Strain	Protein(s)	Reference		
HUMAN INFLUENZA VIRUS	Laboratory strain / pandemic strain	H1N1	X	A/Brevig Mission/1/1918	NA	(219)		
			X	A/California/04/2009	HA, NA, M1	(93,100,123,124,224,226,227,237)		
			X	A/Puerto Rico/8/1934	HA, NA, M1	(99,100,116,121,122,134,136,141,143,144,153,176,180,193,228,232,233,244)		
			X	A/South Carolina/1/1918	HA	(219,229)		
			X	A/WSN/1933	M1, M2	(81,220,221)		
		H3N2	X	A/Aichi/2/1968	HA	(75)		
			X	A/Aichi/2/1968-x31	HA	(143)		
			X	A/Hong Kong/1/1968	HA, NA, M	(75,232)		
			X	A/Udorn/72	HA, NA, M1, M2	(95,100,112,218,219)		
		HPAI	H5N1	1	A/Cambodia/JP52a/2005	HA, NA	(123)	
	1			A/Hanoi/30408/2005	HA, NA	(114)		
	1			A/Thailand/1(KAN-1)/2004	HA, NA, M2	(126,220,221)		
	1			A/Viet Nam/1203/2004	HA, NA, M1	(122,124,134,140,141,176,220,221,225,232,233,235)		
	2.1.3.2			A/Indonesia/05/2005	HA, NA, M1	(131,140,141,175,199,232,236,241)		
	2.3.4			A/Anhui/1/2005	HA	(221)		
	Other Human IV	H1N1	X	A/Changchun/01/2009	HA, NA, M1	(230)		
			X	A/Gansu Chengguan/1129/2007	NA	(123)		
			X	A/Korea/01-2-9/2009	HA, NA, M1, M2	(105)		
			X	A/New Caledonia/20/1999	HA	(140)		
			X	A/New York/312/2001	M, M1	(124,229)		
		H2N2	X	A/Singapore/1/1957	NA	(75)		
		H3N2	X	A/Fujian/411/2002	HA, NA, M1	(150)		
			X	A/Hiroshima/52/2005	HA	(100)		
			X	A/New York/55/2004	HA	(233)		
			X	A/Taiwan/083/2006	HA, NA, M1, M2	(114,115)		
		H6N1	X	A/Taiwan/2/2013	HA, NA	(115)		
		H7N2	X	A/NewYork/107/2003	HA	(140,233)		
		H7N9	X	A/Anhui/1/2013	HA, NA	(112,199,236)		
			X	A/Shanghai/1/2013	HA, NA	(112,199)		
			X	A/Shanghai/2/2013	HA	(141)		
			X	A/Taiwan/S02076/2013	HA, NA, M1	(147)		
			X	A/Wuxi/1/2013	HA, NA, M1	(125)		
		H9N2	X	A/Hong Kong/1073/99	HA, NA, M1	(98)		
			X	A/Hong Kong/33982/2009	HA	(141,233)		
		H10N8	X	A/Jiangxi/IPB13a/2013	HA	(141)		
		B	X	B/Shanghai/361/2002	HA	(140)		
			X	B/Yamagata/16/1988	NA	(99)		
		OTHER INFLUE	Avian	H3N8	X	A/pintail/Ohio/339/1987	HA	(229)
				H5N1	Am-nonGsGD	A/mallard/Maryland/802/2007	HA	(229)
					EA-nonGsGD	A/duck/Hokkaido/Vac-1/2004	HA, NA, M1	(231)
				HPAI H5N1	0	A/goose/Guangdong/1/96	M1	(123)

		2.1.3	A/chicken/WestJava(Sbg)/29/2007	HA	(142,234)	
		2.2.1	A/chicken/Egypt/121/2012	HA, NA	(142,234)	
		2.3.2.1	A/chicken/Korea/Gimje/2008	HA, M1	(135)	
		2.3.4.4	A/chicken/Germany/2014	HA	(142)	
		2.5	A/chicken/Korea/ES/2003	HA, NA, M1	(179)	
		9	A/chicken/Hubei/489/2004	HA, NA, M1	(222)	
	H5N3	EA-nonGsGD	A/duck/France/02166/2002	HA, NA	(223)	
	H5N8	2.3.4.4	A/mallard/Korea/W452/2014	HA, NA	(180)	70
	H6N1	X	A/partridge/Taiwan/LU1/99	M1	(245)	
	H7N1	X	A/chicken/FPV/Rostock/1934	HA, NA, M2	(126)	71
		X	A/chicken/Italy/1067/99	M	(223)	
		X	A/duck/Taiwan(H7N1)	HA	(245)	72
	H7N3	X	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012	HA, NA	(199)	
		X	A/turkey/Oregon/1971	HA	(234)	73
	H9N2	X	A/chicken/Korea/01310/2001	HA, M1	(145)	
		X	A/turkey/Wisconsin/1/1966	HA	(234)	74
	Swine	H2N3	X	A/swine/Missouri/4296424/2006	HA	(140)
	Canine	H3N2	X	A/canine/Korea/LBM412/2008	HA, M1	(174)
	Meerkat	HPAI H5N1	2.3.2.1	A/meerkat/Shanghai/SH-1/2012	HA, NA, M1	(196)
	Other	H7N3	X	A/environment/Maryland/261/2006	HA	(229)
						76

77

78

79

80 **Supplementary table 2:** Details of vector construct used for influenza VLP production. M1 can be replaced with proteins from other enveloped viruses
81 (referred as pseudotyping, see [8]): human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) gag [22,40], friend–murine leukemia virus (MLV) Gag or GagPol [51,169], bovine
82 immunodeficiency virus (BIV) gag (Bgag) [70,71], G protein of vesicular stomatitis virus (VSVG) [16,46,65]. * Schmeisser et al. used the modified vaccinia virus
83 Ankara (MVA) system in order to transduce Vero cells [47].

	Protein(s) number	Expressed influenza genes	Recombinant BV (Insect cells)	Bacmam (Mammalian cells)	Plasmid (Mammalian cells)	
SINGLE EXPRESSION	1	HA	[16,64,186]		[52]([47])*	
		NA	[16]		[48]([47])*	
		M1	[16,35,168]		[53]([47])*	
CO-EXPRESSION	2	HA - M1	[64,75,158,166,168,172,186]		(([47])*	
		HA - NA			(([47])*	
		NA - M1	[168]			
		NA - M			[49]	
		Gag - HA			[51]	
	3	HA - NA - M1	[13,21,65,80,107,110,129,131,161,168,173,174]		[46]	[46]
		HA - NA - M	[160]			
		HA - NA - Bgag	[70,169]			
	4	HA - NA - M1 - M2	[16,63,156]			
		NA-M1-M2-VSVG (or VSVG/HA)	[16]			
		HA - NA - M1 -VSVG			[46,65]	
	5	triple HA - NA - M1	[69,170]			
		triple HA - NA - Bgag	[71,171]			
	6	quadruple HA - NA - Bgag	[70]			
CO-INFECTION / CO-TRANSFECTION	2	HA + M1	[22,23,35,72-74,105,106,126,155,163,164,166]			
		NA + M1	[185]			
		HA + NA			[52]	
		M1 + M2			[53]	
		HA + Gag / GagPol			[51]	

	3	HA + NA + M	[21]	[52]
		HA + NA + M1	[76,111,162,167]	[22,48,50]
		HA + NA + Gag / GagPol		[22,51]
	9	HA+NA+M1+M2+PB1+PB2+PA+NP+NS2		[37]
COMBINATION	3	NA - M2 + M1	[157]	
		HA - M1 + NA	[158]	
		HA - NA + M1	[165]	[(47)]*
		Gag - HA + NA		[51]
	4	HA - M1 + NA - M2	[157,158]	
	6	Double HA – M1 + Triple HA – M1	[29]	
STABLE TRANSFECTION	2	HA – NA		[40]
	3	HA – NA – Gag		[84]
		HA - NA (STABLE) + M1/Gag (TRANSIENT)		[40]
	4	HA - NA (STABLE) + M1 + M2 (TRANSIENT)	[28]	
		HA – NA – M1 – M2		[38,39]
	6	Double HA (STABLE) + Triple HA – M1	[29]	

84

85

BIBLIOGRAPHY :

1. Sands P, Mundaca-shah C, Dzau VJ. Special Report The Neglected Dimension of Global Security — A Framework for Countering Infectious-Disease Crises. , 1281–1287 (2016).
2. Delfraissy J-F, Yazdanpanah Y, Levy Y. REACTing: the French response to infectious disease crises. *The Lancet* [Internet]. 6736(16), 9–11 (2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616300599>.
3. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* [Internet]. 21(16), 1776–1779 (2003). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X03000719>.
4. Malik Peiris JS. Avian influenza viruses in humans. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 28(1), 161–173 (2009).
5. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews. Drug discovery* [Internet]. 14(3), 167–82 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25722244>.
6. Nakowitsch S, Waltenberger AM, Wressnigg N, et al. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnology Journal*. 9(3), 405–414 (2014).
7. Kang S-M, Song J-M, Quan F-S, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Research*. 143(2), 140–146 (2009).
8. Haynes JR. Influenza virus-like particle vaccines. *Expert review of vaccines* [Internet]. 8(4), 435–45 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348559>.
9. Lee Y-T, Kim K-H, Ko E, et al. New vaccines against influenza virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research* [Internet]. 3(1), 12 (2014). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890446&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
10. Quan F-S, Lee Y-T, Kim K-H, Kim M-C, Kang S-M. Progress in Developing Virus-like Particle Influenza Vaccines. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 584(April), 14760584.2016.1175942 (2016). Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2016.1175942>.
11. Landry N, Pillet S, Favre D, et al. Influenza virus-like particle vaccines made in *Nicotiana benthamiana* elicit durable, poly-functional and cross-reactive T cell responses to influenza HA antigens. *Clinical Immunology* [Internet]. 154(2), 164–177 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2014.08.003>.
12. Valero-Pacheco N, Pérez-Toledo M, Villasís-Keever MÁ, et al. Antibody persistence in adults two years after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza virus-like particle vaccine. *PLoS ONE*. 11(2), 1–13 (2016).
13. López-Macías C, Ferat-Osorio E, Tenorio-Calvo A, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. *Vaccine* [Internet]. 29(44), 7826–34 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816199>.
14. Pillet S, Aubin É, Trépanier S, et al. A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. *Clinical Immunology* [Internet]. 168, 72–87 (2016). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.03.008>.
15. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert review of vaccines*. 8(12), 1681–1692 (2009).
16. Latham T, Galarza JM. Formation of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles following Simultaneous Expression of Only Four Structural Proteins. *Society*. 75(13), 6154–6165

-
- (2001).
17. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 111(3), 425–440 (2014).
 18. Lin S-Y, Chung Y-C, Hu Y-C. Update on baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert review of vaccines* [Internet]. 21(January), 1–21 (2014). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155825>.
 19. Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 7(3), 363–371 (2008). Available from: <http://www.expert-reviews.com/doi/pdf/10.1586/14760584.7.3.363>.
 20. Palmberger D, Klausberger M, Berger I, Grabherr R. MultiBac turns sweet. *Bioengineered*. 4(2), 78–83 (2013).
 21. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* [Internet]. 23(50), 5751–9 (2005). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143432>.
 22. Margine I, Martinez-Gil L, Chou YY, Krammer F. Residual Baculovirus in Insect Cell-Derived Influenza Virus-Like Particle Preparations Enhances Immunogenicity. *PLoS ONE*. 7(12) (2012).
 23. Krammer F, Schinko T, Palmberger D, Tauer C, Messner P, Grabherr R. Trichoplusia ni cells (High Five™) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Molecular Biotechnology*. 45(3), 226–234 (2010).
 24. Fernandes F, Teixeira AP, Carinhas N, Carrondo MJT, Alves PM. Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert review of vaccines* [Internet]. 12(2), 225–36 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414412>.
 25. Bleckmann M, Schürig M, Chen FF, *et al.* Identification of essential genetic baculoviral elements for recombinant protein expression by transactivation in Sf21 insect cells. *PLoS ONE*. 11(3), 1–19 (2016).
 26. Shen X, Hacker DL, Baldi L, Wurm FM. Virus-free transient protein production in Sf9 cells. *Journal of Biotechnology* [Internet]. 171(1), 61–70 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.018>.
 27. Shen X, Pitol AK, Bachmann V, Hacker DL, Baldi L, Wurm FM. A simple plasmid-based transient gene expression method using High Five cells. *Journal of Biotechnology* [Internet]. 216, 67–75 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.007>.
 28. Hong GP, Park JH, Lee HH, *et al.* Production of influenza virus-like particles from stably transfected Trichoplusia ni BT1 TN-5B1-4 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 20(3), 506–514 (2015).
 29. Sequeira DP, Correia R, Carrondo MJT, Roldão A, Teixeira AP, Alves PM. Combining stable insect cell lines with baculovirus-mediated expression for multi-HA influenza VLP production. *Vaccine* [Internet]. 9(October), 107316 (2017). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.043>.
 30. Palmberger D, Wilson IBH, Berger I, Grabherr R, Rendic D. SweetBac: A New Approach for the Production of Mammalianised Glycoproteins in Insect Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 7(4), e34226 (2012). Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034226>.
 31. Wilde M, Klausberger M, Palmberger D, Ernst W, Grabherr R. Tnao38, high five and Sf9-- evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnology letters* [Internet]. 36(4), 743–9 (2014). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3955137&tool=pmcentrez&render>

-
- type=abstract.
32. Aucoin MG, Mena J a, Kamen A a. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Current gene therapy* [Internet]. 10(3), 174–86 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380645>.
 33. Vicente T, Roldão A, Peixoto C, Carrondo MJT, Alves PM. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *Journal of invertebrate pathology* [Internet]. 107 Suppl, S42-8 (2011). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201111000772>.
 34. Monteiro F, Bernal V, Alves PM. The role of host cell physiology in the productivity of the baculovirus-insect cell system: Fluxome analysis of *Trichoplusia ni* and *Spodoptera frugiperda* cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*. 114(3), 674–684 (2016).
 35. Klausberger M, Wilde M, Palmberger D, *et al.* One-shot vaccination with an insect cell-derived low-dose influenza A H7 virus-like particle preparation protects mice against H7N9 challenge. *Vaccine* [Internet]. 32(3), 355–362 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.036>.
 36. Szécsi J, Boson B, Johnsson P, *et al.* Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Virology journal* [Internet]. 3, 70 (2006). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1569823&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 37. Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb R a. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *Journal of virology*. 81(13), 7111–7123 (2007).
 38. Wu C-Y, Yeh Y-C, Yang Y-C, *et al.* Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus. *PloS one* [Internet]. 5(3), e9784 (2010). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2842297&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 39. Yang J-R, Chen C-Y, Kuo C-Y, *et al.* A novel H6N1 virus-like particle vaccine induces long-lasting cross-clade antibody immunity against human and avian H6N1 viruses. *Antiviral Research* [Internet]. 126, 8–17 (2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354215300218>.
 40. Venereo-Sanchez A, Gilbert R, Simoneau M, *et al.* Hemagglutinin and neuraminidase containing virus-like particles produced in HEK-293 suspension culture: An effective influenza vaccine candidate. *Vaccine* [Internet]. , 1–10 (2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X1630264X>.
 41. Tom R, Bisson L, Durocher Y. Transfection of HEK293-EBNA1 cells in suspension with linear PEI for production of recombinant proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*. 3(3), 1–5 (2008).
 42. Ansoorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, Durocher Y, Henry O, Kamen A. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *The Journal of Gene Medicine* [Internet]. 11(10), 868–876 (2009). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jgm.1370>.
 43. Hsu CS, Ho YC, Wang KC, Hu YC. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 88(1), 42–51 (2004).
 44. Krammer F, Grabherr R. Alternative influenza vaccines made by insect cells. *Trends in molecular medicine* [Internet]. 16(7), 313–20 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570562>.
 45. Chen CY, Lin CY, Chen GY, Hu YC. Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology Advances*

-
- [Internet]. 29(6), 618–631 (2011). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.004>.
46. Tang X-C, Lu H-R, Ross TM. Baculovirus-Produced Influenza Virus-like Particles in Mammalian Cells Protect Mice from Lethal Influenza Challenge. *Viral immunology*. 24(4), 311–319 (2011).
 47. Schmeisser F, Adamo JE, Blumberg B, *et al.* Production and characterization of mammalian virus-like particles from modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza H5N1 hemagglutinin and neuraminidase. *Vaccine* [Internet]. 30(23), 3413–22 (2012). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465746>.
 48. Lai JCC, Chan WWL, Kien F, Nicholls JM, Peiris JSM, Garcia JM. Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. *Journal of General Virology*. 91(9), 2322–2330 (2010).
 49. Easterbrook JD, Schwartzman LM, Gao J, *et al.* Protection against a lethal H5N1 influenza challenge by intranasal immunization with virus-like particles containing 2009 pandemic H1N1 neuraminidase in mice. *Virology* [Internet]. 432(1), 39–44 (2012). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.003>.
 50. Zhang L, Lu J, Chen Y, *et al.* Characterization of Humoral Responses Induced by an H7N9 Influenza Virus-Like Particle Vaccine in BALB/C Mice. *Viruses* [Internet]. 7(8), 4369–4384 (2015). Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/8/2821/>.
 51. Szécsi J, Gabriel G, Edfeldt G, Michelet M, Klenk HD, Cosset F-L. DNA vaccination with a single-plasmid construct coding for viruslike particles protects mice against infection with a highly pathogenic avian influenza A virus. *The Journal of infectious diseases*. 200(2), 181–190 (2009).
 52. Chlanda P, Schraidt O, Kummer S, *et al.* Structural analysis of the roles of influenza A virus membrane-associated proteins in assembly and morphology. *Journal of Virology* [Internet]. 89(June), JVI.00592-15 (2015). Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00592-15>.
 53. Wang D, Harmon A, Jin J, *et al.* The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *Journal of virology*. 84(9), 4673–4681 (2010).
 54. Le Ru A, Jacob D, Transfiguracion J, Ansorge S, Henry O, Kamen AA. Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing. *Vaccine* [Internet]. 28(21), 3661–71 (2010). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10003762>.
 55. Côté J, Garnier A, Massie B, Kamen A. Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnology and bioengineering* [Internet]. 59(5), 567–75 (1998). Available from: [http://doi.wiley.com/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980905\)59:5%3C567::AID-BIT6%3E3.0.CO;2-8](http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5%3C567::AID-BIT6%3E3.0.CO;2-8).
 56. Kanagarajan S, Tolf C, Lundgren A, Waldenström J, Brodelius PE. Transient Expression of Hemagglutinin Antigen from Low Pathogenic Avian Influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* [Internet]. 7(3), e33010 (2012). Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033010>.
 57. Saxena P, Lomonosoff G. Production of Virus-Like Particles in Plants. *Viral Nanotechnology* [Internet]. (November), 251–262 (2015). Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18596-19>.
 58. D’Aoust M-A, Lavoie P-O, Couture MM-J, *et al.* Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant biotechnology journal* [Internet]. 6(9), 930–40 (2008). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076615>.
 59. D’Aoust M-A, Couture MM-J, Charland N, *et al.* The production of hemagglutinin-based virus-

-
- like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant biotechnology journal* [Internet]. 8(5), 607–19 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199612>.
60. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* [Internet]. 143(2), 147–161 (2009). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170209002093>.
 61. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 411(2), 229–236 (2011).
 62. Sokolenko S, George S, Wagner A, Tuladhar A, Andrich JMS, Aucoin MG. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnology Advances* [Internet]. 30(3), 766–781 (2012). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.009>.
 63. Eibl R, Steiger N, Wellnitz S, Vicente T, John C, Eibl D. Fast Single-Use VLP Vaccine Productions Based on Insect Cells and the Baculovirus Expression Vector System: Influenza as Case Study [Internet]. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. , 99–125 (2013). Available from: http://link.springer.com/10.1007/10_2013_186.
 64. Choi JG, Kim MC, Kang HM, *et al.* Protective efficacy of baculovirus-derived influenza virus-like particles bearing H5 HA alone or in combination with M1 in chickens. *Veterinary Microbiology* [Internet]. 162(2–4), 623–630 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.035>.
 65. Thompson CM, Petiot E, Mullick A, Aucoin MG, Henry O, Kamen AA. Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC biotechnology* [Internet]. 15(1), 31 (2015). Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4432999&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
 66. Chen Q, Lai H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics* [Internet]. 9(1), 26–49 (2013). Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3667944&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
 67. Choi HJ, Song JM, Bondy BJ, Compans RW, Kang SM, Prausnitz MR. Effect of osmotic pressure on the stability of whole inactivated influenza vaccine for coating on microneedles. *PLoS ONE*. 10(7), 1–22 (2015).
 68. Jutras P V., D’Aoust MA, Couture MMJ, *et al.* Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants. *Biotechnology Journal*. 10(9), 1478–1486 (2015).
 69. Pushko P, Pearce MB, Ahmad A, *et al.* Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. *Vaccine* [Internet]. 29(35), 5911–8 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723354>.
 70. Tretyakova I, Hidajat R, Hamilton G, *et al.* Preparation of quadri-subtype influenza virus-like particles using bovine immunodeficiency virus gag protein. *Virology* [Internet]. 487, 163–171 (2016). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.007>.
 71. Kapczynski DR, Tumpey TM, Hidajat R, *et al.* Vaccination with virus-like particles containing H5 antigens from three H5N1 clades protects chickens from H5N1 and H5N8 influenza viruses. *Vaccine* [Internet]. , 1–7 (2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16001377>.
 72. Quan FS, Steinhauer D, Huang C, Ross TM, Compans RW, Kang S-M. A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs. *Vaccine* [Internet]. 26(26), 3352–61 (2008). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468740>.

-
73. Quan F-S, Huang C, Compans RW, Kang S-M. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *Journal of virology* [Internet]. 81(7), 3514–24 (2007). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866067&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 74. Lee DH, Park JK, Lee YN, *et al.* H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals. *Vaccine* [Internet]. 29(23), 4003–4007 (2011). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.067>.
 75. Monteiro F, Bernal V, Chaillet M, Berger I, Alves PM. Targeted supplementation design for improved production and quality of enveloped viral particles in insect-cell baculovirus expression system. *Journal of biotechnology* [Internet]. 233, 34–41 (2016). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.029>.
 76. Jack Hu C-M, Chien C-Y, Liu M-T, *et al.* Multi-antigen avian influenza a (H7N9) virus-like particles: particulate characterizations and immunogenicity evaluation in murine and avian models. *BMC Biotechnology* [Internet]. , 1–12 (2017). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-016-0321-6>.
 77. Roldão A, Oliveira R, Carrondo MJT, Alves PM. Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *Journal of Virological Methods*. 159(1), 69–80 (2009).
 78. Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *Journal of virology*. 74(1), 547–551 (2000).
 79. Carinhas N, Bernal V, Yokomizo AY, Carrondo MJT, Oliveira R, Alves PM. Baculovirus production for gene therapy: The role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81(6), 1041–1049 (2009).
 80. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, *et al.* Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* [Internet]. 25(19), 3871–8 (2007). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337102>.
 81. Invitrogen life technologies. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques [Internet]. Available from: http://download.bioon.com.cn/view/upload/month_0808/20080806_0ec5b73966bacf682c0c4wwVmuYVwFyE.attach.pdf.
 82. Petiot E, Kamen A. Real time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures. *Biotechnol Prog*. 29(1), 275–284 (2012).
 83. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines* [Internet]. 9(10), 1149–1176 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923267>.
 84. Venereo-Sanchez A, Simoneau M, Lanthier S, *et al.* Process intensification for high yield production of influenza H1N1 Gag virus-like particles using an inducible HEK-293 stable cell line. *Vaccine* [Internet]. , 1–9 (2017). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17308010>.
 85. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *Journal of biotechnology* [Internet]. 166(4), 152–65 (2013). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165613002125>.
 86. Chan RB, Tanner L, Wenk MR. Implications for lipids during replication of enveloped viruses. *Chemistry and Physics of Lipids* [Internet]. 163(6), 449–459 (2010). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.03.002>.

-
87. Robinson JM. An Alternative to the Scale-up and Distribution of Pandemic Influenza Vaccine. *BioPharm International Supplements* [Internet]. (2009). Available from: <http://www.biopharminternational.com/alternative-scale-and-distribution-pandemic-influenza-vaccine>.
 88. Hahn T, Courbron D, Hamer M, *et al.* Rapid Manufacture and Release of a GMP Batch of Avian Influenza A(H7N9) Virus-Like Particle Vaccine Made Using Recombinant Baculovirus-Sf9 Insect Cell Culture Technology. *BioProcessing Journal* [Internet]. 12(2), 4–17 (2013). Available from: <http://www.bioprocessingjournal.com/index.php/article-downloads/527-j122-rapid-manufacture-and-release-of-a-gmp-batch-of-avian-influenza-ah7n9-virus-like-particle-vaccine-made-using-recombinant-baculovirus-sf9-insect-cell-culture-technology>.
 89. Wirz H, Sauer-Budge AF, Briggs J, Sharpe A, Shu S, Sharon A. Automated Production of Plant-Based Vaccines and Pharmaceuticals. *Journal of Laboratory Automation* [Internet]. 17(6), 449–457 (2012). Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068212460037>.
 90. Landry N, Barbeau B, Charland N, *et al.* Plants As an Innovative and Accelerated Vaccine-Manufacturing Solution. *BioPharm International Supplements* [Internet]. (2011). Available from: <http://www.biopharminternational.com/plants-innovative-and-accelerated-vaccine-manufacturing-solution>.
 91. Vicente T, Mota JPB, Peixoto C, Alves PM, Carrondo MJT. Rational design and optimization of downstream processes of virus particles for biopharmaceutical applications: Current advances. *Biotechnology Advances* [Internet]. 29(6), 869–878 (2011). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.004>.
 92. Effio CL, Hubbuch J. Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. *Biotechnology Journal*. 10(5), 715–727 (2015).
 93. Kissmann J, Joshi SB, Haynes JR, Dokken L, Richardson C, Middaugh CR. H1N1 Influenza Virus-Like Particles : Physical Degradation Pathways and Identification of Stabilizers. 100(2), 634–645 (2011).
 94. Kalbfuss B, Genzel Y, Wolff M, Zimmermann A, Morenweiser R, Reichl U. Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 97(1), 73–85 (2007). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21139>.
 95. Smith GE, Pushko P. Avian Influenza Chimeric VlpS [Internet]. (2009). Available from: <https://lens.org/102-886-771-416-164>.
 96. Besnard L, Fabre V, Fettig M, *et al.* Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices. *Biotechnology Advances*. 34(1), 1–13 (2016).
 97. Negrete A, Pai A, Shiloach J. Use of hollow fiber tangential flow filtration for the recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods* [Internet]. 195, 240–246 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.017>.
 98. Wolff MW, Reichl U. Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 10(10), 1451–1475 (2011). Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.11.111>.
 99. Sugita Y, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y. Ultracentrifugation deforms unfixed influenza A virions. *Journal of General Virology*. 92(11), 2485–2493 (2011).
 100. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathogens*. 4(6), 1–13 (2008).
 101. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, *et al.* Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles. *Journal of Chromatography A*. 1455, 93–101 (2016).
 102. Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and

- HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *Journal of Immunological Methods*. 338(1–2), 21–30 (2008).
103. Nayak DP, Lehmann S, Reichl U. Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 823(2), 75–81 (2005).
 104. Lin SY, Chiu HY, Chiang BL, Hu YC. Development of EV71 virus-like particle purification processes. *Vaccine* [Internet]. 33(44), 5966–5973 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.077>.
 105. Lee D-H, Bae S-W, Park J-K, *et al.* Virus-like particle vaccine protects against H3N2 canine influenza virus in dog. *Vaccine* [Internet]. 31(32), 3268–3273 (2013). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X13006014>.
 106. Song J-M, Choi C-W, Kwon S-O, Compans richard W, Kang S-M, Kim S Il. Proteomic characterization of influenza H5N1 virus-like particles and their protective immunogenicity. *J Proteome Res*. 10(8), 3450–3459 (2012).
 107. Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, *et al.* Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS ONE*. 3(1) (2008).
 108. Hammonds J, Chen X, Zhang X, Lee F, Spearman P. Advances in methods for the production, purification, and characterization of HIV-1 Gag-Env pseudovirion vaccines. *Vaccine*. 25(47), 8036–8048 (2007).
 109. Vicente T, Burri S, Wellnitz S, Walsh K, Rothe S, Liderfelt J. Fully aseptic single-use cross flow filtration system for clarification and concentration of cytomegalovirus-like particles. *Engineering in Life Sciences*. 14(3), 318–326 (2014).
 110. Park JK, Lee DH, Youn HN, *et al.* Protective efficacy of crude virus-like particle vaccine against HPAI H5N1 in chickens and its application on DIVA strategy. *Influenza and other Respiratory Viruses*. 7(3), 340–348 (2013).
 111. Park YC, Song JM. Preparation and immunogenicity of influenza virus-like particles using nitrocellulose membrane filtration. *Clinical and experimental vaccine research* [Internet]. 6(1), 61–66 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28168175><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5292359>.
 112. Rajamanickam V, Herwig C, Spadiut O. Monoliths in Bioprocess Technology. *Chromatography* [Internet]. 2(2), 195–212 (2015). Available from: <http://www.mdpi.com/2227-9075/2/2/195/>.
 113. Orr V, Zhong L, Moo-Young M, Chou CP. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. *Biotechnology Advances* [Internet]. 31(4), 450–465 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.007>.
 114. Banjac M, Roethl E, Gelhart F, *et al.* Purification of Vero cell derived live replication deficient influenza A and B virus by ion exchange monolith chromatography. *Vaccine* [Internet]. 32(21), 2487–92 (2014). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14003132>.
 115. Ladd Effio C, Hahn T, Seiler J, *et al.* Modeling and simulation of anion-exchange membrane chromatography for purification of Sf9 insect cell-derived virus-like particles. *Journal of Chromatography A* [Internet]. 1429, 142–154 (2016). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.006>.
 116. GE Healthcare Life Sciences. Removal of DNA and baculovirus from influenza virus-like particles using Capto™ Q. *BioPharm International* [Internet]. , 1–8 (2011). Available from: <http://www.processdevelopmentforum.com/files/articles/28992441AA.pdf>.
 117. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, *et al.* Separation of HIV-1 gag virus-like particles from vesicular particles impurities by hydroxyl-functionalized monoliths. *Journal of Separation*

-
- Science*. 40(4), 979–990 (2017).
118. Kalbfuss B, Flockerzi D, Seidel-Morgenstern A, Reichl U. Size-exclusion chromatography as a linear transfer system: Purification of human influenza virus as an example. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 873(1), 102–112 (2008).
 119. Sadowski T, Li J, Sarathi B, Pincus S. Release and Stability Testing Programs for a Novel Virus-Like Particle Vaccine. *BioPharm International Supplements* [Internet]. 23 (Suppl., 26–34 (2010). Available from: <http://www.biopharminternational.com/release-and-stability-testing-programs-novel-virus-particle-vaccine>.
 120. Transfiguracion J, Jorio H, Meghrou J, Jacob D, Kamen A. High yield purification of functional baculovirus vectors by size exclusion chromatography. *Journal of virological methods* [Internet]. 142(1–2), 21–8 (2007). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306891>.
 121. Kon TC, Onu A, Berbecila L, *et al*. Influenza vaccine manufacturing: Effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PLoS ONE*. 11(3), 1–19 (2016).
 122. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications [Internet]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf>.
 123. Council of Europe. INFLUENZA VACCINE (SURFACE ANTIGEN, INACTIVATED, PREPARED IN CELL CULTURES). European pharmacopoeia. , 865–867 (2009).
 124. Brito LA, Singh M. COMMENTARY: Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During Preclinical Research. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 100(1), 34–37 (2011). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915323467>.
 125. Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh CR, Prusik T, Volkin DB. Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals* [Internet]. 42(5), 237–259 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.05.007>.
 126. Quan F-S, Ko E-J, Kwon Y-M, Joo KH, Compans RW, Kang S-M. Mucosal adjuvants for influenza virus-like particle vaccine. *Viral immunology* [Internet]. 26(6), 385–95 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24236855>.
 127. Beljanski V, Chiang C, Kirchenbaum GA, *et al*. Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant. *Journal of Virology* [Internet]. 89(20), 10612–10624 (2015). Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01526-15>.
 128. Allen JD, Owino SO, Carter DM, *et al*. Broadened immunity and protective responses with emulsion-adjuvanted H5 COBRA-VLP vaccines. *Vaccine* [Internet]. 35(38), 5209–5216 (2017). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.107>.
 129. Ren Z, Ji X, Meng L, *et al*. H5N1 influenza virus-like particle vaccine protects mice from heterologous virus challenge better than whole inactivated virus. *Virus Research* [Internet]. 200(C), 9–18 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.007>.
 130. Chung KY, Coyle EM, Jani D, *et al*. ISCOMATRIX™ adjuvant promotes epitope spreading and antibody affinity maturation of influenza A H7N9 virus like particle vaccine that correlate with virus neutralization in humans. *Vaccine* [Internet]. 33(32), 3953–3962 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.047>.
 131. Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, *et al*. Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: Homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine* [Internet]. 31(40), 4305–4313 (2013). Available from:

-
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.043>.
132. Bosch D, Schots A. Plant glycans: friend or foe in vaccine development? *Expert review of vaccines*. 9(March), 835–842 (2010).
 133. Bracewell DG, Francis R, Smales CM. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control. *Biotechnology and Bioengineering*. 112(9), 1727–1737 (2015).
 134. Shi X, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Current drug targets* [Internet]. 8(10), 1116–25 (2007). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3647355&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 135. Ward BJ, Landry N, Trépanier S, *et al*. Human antibody response to N-glycans present on plant-made influenza virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* [Internet]. 32(46), 6098–6106 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.079>.
 136. Hämmerling F, Pieler MM, Hennig R, *et al*. Influence of the production system on the surface properties of influenza A virus particles. *Engineering in Life Sciences* [Internet]. (2017). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201700058>.
 137. Tate MD, Job ER, Deng YM, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses*. 6(3), 1294–1316 (2014).
 138. Lin SC, Jan JT, Dionne B, *et al*. Different Immunity Elicited by Recombinant H5N1 Hemagglutinin Proteins Containing Pauci-Mannose, High-Mannose, or Complex Type N-Glycans. *PLoS ONE*. 8(6) (2013).
 139. de Vries RP, Smit CH, de Bruin E, *et al*. Glycan-Dependent Immunogenicity of Recombinant Soluble Trimeric Hemagglutinin. *Journal of Virology* [Internet]. 86(21), 11735–11744 (2012). Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01084-12>.
 140. Wu C-Y, Lin C-W, Tsai T-I, *et al*. Influenza A surface glycosylation and vaccine design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. , 201617174 (2016). Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1617174114>.
 141. Chen JR, Ma C, Wong CH. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza. *Trends in Biotechnology* [Internet]. 29(9), 426–434 (2011). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.007>.
 142. An Y, Rininger JA, Jarvis DL, *et al*. Comparative glycomics analysis of influenza hemagglutinin (H5N1) produced in vaccine relevant cell platforms. *Journal of Proteome Research*. 12(8), 3707–3720 (2013).
 143. Vézina LP, Faye L, Lerouge P, *et al*. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal*. 7(5), 442–455 (2009).
 144. Kim H-S, Jeon J-H, Lee KJ, Ko K. N-glycosylation modification of plant-derived virus-like particles: an application in vaccines. *BioMed research international* [Internet]. 2014, 249519 (2014). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4055563&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 145. Krammer F. Strategies to induce broadly protective antibody responses to viral glycoproteins. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 16(5), 503–513 (2017). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2017.1299576>.
 146. Brewer MG, DiPiazza A, Acklin J, Feng C, Sant AJ, Dewhurst S. Nanoparticles decorated with viral antigens are more immunogenic at low surface density. *Vaccine* [Internet]. 35(5), 774–781 (2017). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.049>.

-
147. Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, *et al.* Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nature communications* [Internet]. 5(May), 4816 (2014). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226414>.
 148. Le Mauff F, Mercier G, Chan P, *et al.* Biochemical composition of haemagglutinin-based influenza virus-like particle vaccine produced by transient expression in tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* [Internet]. 13(5), 717–725 (2015). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12301>.
 149. Lundström CS, Mattsson A, Lövgren K, *et al.* Sensitive methods for evaluation of antibodies for host cell protein analysis and screening of impurities in a vaccine process. *Vaccine* [Internet]. 32(24), 2911–2915 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.032>.
 150. Jain NK, Sahni N, Kumru OS, Joshi SB, Volkin DB, Russell Middaugh C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. 93, 42–55 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.023>.
 151. Cromwell MEM, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS Journal* [Internet]. 8(3), E572–E579 (2006). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2761064/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2761064/pdf/12248_2008_Article_83572.pdf.
 152. Zhao Q, Li S, Yu H, Xia N, Modis Y. Virus-like particle-based human vaccines: Quality assessment based on structural and functional properties. *Trends in Biotechnology* [Internet]. 31(11), 654–663 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.002>.
 153. Nerome K, Sugita S, Kuroda K, *et al.* The large-scale production of an artificial influenza virus-like particle vaccine in silkworm pupae. *Vaccine* [Internet]. 33(1), 117–25 (2015). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14015333>.
 154. Thompson CM, Petiot E, Lennaertz A, Henry O, Kamen AA. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology journal* [Internet]. 10, 141 (2013). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655918&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 155. Galarza JM, Latham T, Cupo A. Protection against a Lethal Influenza Virus Challenge. 18(1), 244–251 (2005).
 156. Matassov D, Cupo A, Galarza JM. A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1). *Viral immunology* [Internet]. 20(3), 441–52 (2007). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931114>.
 157. Pan Y-S, Wei H-J, Chang C-C, *et al.* Construction and characterization of insect cell-derived influenza VLP: cell binding, fusion, and EGFP incorporation. *Journal of biomedicine & biotechnology* [Internet]. 2010, 506363 (2010). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3004410&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 158. Wei H-J, Chang W, Lin S-C, *et al.* Fabrication of influenza virus-like particles using M2 fusion proteins for imaging single viruses and designing vaccines. *Vaccine* [Internet]. 29(41), 7163–72 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21651946>.
 159. Tao P, Luo M, Zhu D, *et al.* Virus-like particle vaccine comprised of the HA, NA, and M1 proteins of an avian isolated H5N1 influenza virus induces protective immunity against homologous and heterologous strains in mice. *Viral immunology* [Internet]. 22(4), 273–81 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594398>.
 160. Prel A, Le Gall-Reculé G, Cherbonnel M, Grasland B, Amelot M, Jestin V. Assessment of the protection afforded by triple baculovirus recombinant coexpressing H5, N3, M1 proteins against

-
- a homologous H5N3 low-pathogenicity avian influenza virus challenge in Muscovy ducks. *Avian diseases* [Internet]. 51(1 Suppl), 484–9 (2007). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494615>.
161. Pyo HM, Masic A, Woldeab N, *et al.* Pandemic H1N1 influenza virus-like particles are immunogenic and provide protective immunity to pigs. *Vaccine* [Internet]. 30(7), 1297–1304 (2012). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.083>.
 162. Kang S-M, Yoo D-G, Lipatov AS, *et al.* Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. *PloS one*. 4(3), e4667 (2009).
 163. Quan F-S, Vunnava A, Compans RW, Kang S-M. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PloS one* [Internet]. 5(2), e9161 (2010). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820088&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 164. Jaber Hossain M, Bourgeois M, Quan FS, *et al.* Virus-like particle vaccine containing hemagglutinin confers protection against 2009 H1N1 pandemic influenza. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(12), 2010–2017 (2011).
 165. Wen Z, Ye L, Gao Y, *et al.* Immunization by influenza virus-like particles protects aged mice against lethal influenza virus challenge. *Antiviral research* [Internet]. 84(3), 215–24 (2009). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787645&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
 166. Schwartzman LM, Cathcart AL, Pujanauski LM, Qi L, Kash JC, Taubenberger JK. An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza A virus. *mBio*. 6(4), 1–9 (2015).
 167. Ji X, Ren Z, Xu N, *et al.* Intranasal immunization with influenza virus-like particles containing membrane-anchored cholera toxin B or ricin toxin B enhances adaptive immune responses and protection against an antigenically distinct virus. *Viruses*. 8(4) (2016).
 168. Satomi Yanase MS, Masatoshi Okamoto CMO. Influenza Virus-like Particles Containing HA, NA, and M1 Induced Protection in Chickens against a Lethal Challenge with the Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus. *Journal of Vaccines & Vaccination* [Internet]. 4(6), 1–7 (2013). Available from: <http://www.omicsonline.org/influenza-virus-like-particles-containing-ha-na-and-m1-induced-protection-in-chickens-against-a-lethal-2157-7560.1000201.php?aid=18068>.
 169. Haynes JR, Dokken L, Wiley J a, *et al.* Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge. *Vaccine* [Internet]. 27(4), 530–41 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026705>.
 170. Tretyakova I, Pearce MB, Florese R, Tumpey TM, Pushko P. Intranasal vaccination with H5, H7 and H9 hemagglutinins co-localized in a virus-like particle protects ferrets from multiple avian influenza viruses. *Virology* [Internet]. 442(1), 67–73 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.027>.
 171. Pushko P, Tretyakova I, Hidajat R, *et al.* Virus-like particles displaying H5, H7, H9 hemagglutinins and N1 neuraminidase elicit protective immunity to heterologous avian influenza viruses in chickens. *Virology* [Internet]. 501(November 2016), 176–182 (2017). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682216303737>.
 172. Song JM, Hossain J, Yoo DG, *et al.* Protective immunity against H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. *Virology* [Internet]. 405(1), 165–175 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580392>.
 173. Liu Y V., Massare MJ, Pearce MB, *et al.* Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A(H7N9) virus infection in ferrets. *Vaccine* [Internet]. 33(18),

-
- 2152–2158 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.009>.
174. Pushko P, Kort T, Nathan M, Pearce MB, Smith G, Tumpey TM. Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Vaccine* [Internet]. 28(30), 4771–6 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470801>.
175. Council of Europe. INFLUENZA VACCINE (SPLIT VIRION , INACTIVATED). *European pharmacopoeia*. (8), 867–868 (2008).
176. Rybicki EP. Plant-based vaccines against viruses. *Virology journal* [Internet]. 11(1), 205 (2014). Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4264547&tool=pmcentrez&render_type=abstract%5Cnhttp://www.virologyj.com/content/11/1/205.
177. Landry N, Ward BJ, Trépanier S, *et al.* Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PloS one* [Internet]. 5(12), e15559 (2010). Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3008737&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
178. Vézina L-P, Ward BJ, D’Aoust M-A, *et al.* Influenza Virus-Like Particles Produced in *Nicotiana benthamiana* Protect Against a Lethal Viral Challenge in Mice [Internet]. Springer Berlin Heidelberg, 83–102 (2014) [cited 2016 Sep 16]. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-43836-7_6.
179. Buckland B, Boulanger R, Fino M, *et al.* Technology transfer and scale-up of the Flublok(R) recombinant hemagglutinin (HA) influenza vaccine manufacturing process. *Vaccine* [Internet]. 32(42), 5496–5502 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.074>.
180. Partridge J, Kieny MP. Global production capacity of seasonal influenza vaccine in 2011. *Vaccine* [Internet]. 31(5), 728–731 (2013). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.111>.
181. Medicago. PRESS RELEASE - MEDICAGO TO BUILD \$245M PRODUCTION FACILITY IN QUEBEC CITY [Internet]. (2015). Available from: http://s1.q4cdn.com/816223360/files/documents_news/2015/EXPANSION-MDG-EN.pdf.
182. Yusibov V, Kushnir N, Streatfield SJ. Advances and challenges in the development and production of effective plant-based influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 14(4), 519–535 (2015). Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iev20%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/14760584.2015.989988>.
183. Pillet S, Racine T, Nfon C, *et al.* Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. *Vaccine* [Internet]. 33(46), 6282–6289 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.065>.
184. Novavax. Quadrivalent Influenza VLP Vaccine Dose Ranging Study in Young Adults [Internet]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02307851?term=Novavax&rank=5>.
185. Quan F, Kim M, Lee B, Song J, Compans RW, Kang S. Influenza M1 VLPs containing neuraminidase induce heterosubtypic cross-protection. *Virology* [Internet]. 430(2), 127–135 (2012). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.006>.
186. Chang GR-L, Lai S-Y, Chang P-C, Wang M-Y. Production of immunogenic one-component avian H7-subtype influenza virus-like particles. *Process Biochemistry* [Internet]. 46(6), 1292–1298 (2011). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511311000766>.
187. Tieleman DP, Berendsen HJ. A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer. *Biophysical journal* [Internet]. 74(6), 2786–801 (1998). Available from:

III. Contributions de l'article

Comme il a été dit, la réalisation de cette revue aura permis de dresser l'état de l'art des bioprocédés utilisés pour la production de vaccins influenzae basée sur la stratégie VLP. Ce travail offre une vue d'ensemble des plateformes cellulaires et techniques d'expression associées utilisées pour la production de particules pseudo-virales d'Influenza. Il y a été détaillé les procédés supports d'études pré-cliniques jusqu'aux procédés industriels à large échelle associés à des études clinique de phase III. Une analyse comparative des différentes stratégies a permis d'identifier les systèmes d'expression les plus utilisés et de détailler les avantages et inconvénients de chaque système et stratégie d'expression. Les procédés de purification de ces produits biologiques ont également été détaillés, démontrant que la mise à l'échelle des procédés s'accompagne d'une migration de techniques classiques de purification virale (ultracentrifugation) vers des schémas de purification plus longs. Ces derniers incluent des étapes de purification membranaires et de chromatographie afin de répondre aux contraintes mises en place par les instances réglementaires (également décrites). Ainsi, depuis les preuves de concept établies il y a une quinzaine d'années, les travaux réalisés par les chercheurs académiques et industriels ont permis d'établir cette stratégie comme l'une des plus prometteuse pour concurrencer le procédé d'ovoculture traditionnel, avec plusieurs candidats vaccins en développement (phase III).

Ce travail peut ainsi être utile aux académiques ou aux industriels travaillant dans le domaine de la production vaccinale de particules pseudo-virales enveloppées de manière générale, puisque les bioprocédés ici décrits dans le cas des VLPs Influenza sont similaires à ceux d'autres virus enveloppés, tel que HIV. Le succès industriel de cette stratégie démontre qu'elle pourrait servir au développement de vaccins « chimères » ciblant d'autres pathogènes (par conjugaison des antigènes de ces derniers avec les protéines membranaires d'Influenza) dont la production suivrait les procédés détaillés dans cette revue.

Également, sur un plan personnel, ce travail m'aura permis de m'initier à la rédaction scientifique anglophone et, pour cela, à améliorer mes compétences en matière de recherche bibliographique, d'extraction et de synthèse d'information pertinente afin de résumer l'état de l'art d'un sujet donné. Cette expérience a été enrichissante et me permettra je l'espère de faciliter la réalisation et améliorer la forme de mes prochaines rédactions scientifiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. OMS. Grippe (saisonnière). 2014. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. Nayak DP, Hui EKW, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*. 2004;106(2 SPEC.ISS.):147–65.
3. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* [Internet]. 2009 Aug;143(2):147–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170209002093>
4. Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, Thomas B, Trudgian D, Martínez-Alonso M, et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nature communications* [Internet]. 2014;5(May):4816. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226414>
5. Acheson NH. *Fundamentals of molecular virology*. John Wiley & Sons; 2011. 500 p.
6. Centers for Diseases Control and Prevention. Images of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) [Internet]. [cited 2018 Jul 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/images.htm>
7. Noda T. Native morphology of influenza virions. *Frontiers in Microbiology*. 2012;2(JAN):1–5.
8. Mubareka S, Palese P. *Influenza Virus: The Biology of a Changing Virus*. *Influenza Vaccines for the Future* [Internet]. Basel: Springer Basel; 2011. p. 3–26. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-0346-0279-2_1
9. Das K, Aramini JM, Ma L-C, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature Structural & Molecular Biology* [Internet]. 2010 May 11;17(5):530–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.1779>
10. Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza glycoproteins: Hemagglutinin and neuraminidase. *Textbook of Influenza* [Internet]. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 67–100. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118636817.ch5>
11. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology* [Internet]. 2002

-
- May;12(3):159–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.352>
12. de Graaf M, Fouchier RAM, Ablan S, Rawat S, Blumenthal R, Puri A, et al. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO Journal* [Internet]. 2014;33(8):823–41. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1002/emboj.201387442>
 13. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews Drug discovery* [Internet]. 2015;14(3):167–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25722244>
 14. Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF, Martina BEE, Bestebroer TM, Fouchier RAM. Influenza B Virus in Seals. *Science*. 2000;288(2000):1051–2.
 15. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *Journal of virology* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2006 Apr [cited 2016 Oct 4];80(7):3675–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537638>
 16. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 2013;12(9):1085–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024871>
 17. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annual review of pathology* [Internet]. NIH Public Access; 2008 [cited 2016 Oct 4];3:499–522. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039138>
 18. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe* [Internet]. NIH Public Access; 2010 Jun 25 [cited 2016 Oct 4];7(6):440–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542248>
 19. World Health Organization Writing Group WHOW, Bell D, Nicoll A, Fukuda K, Horby P, Monto A, et al. Non-pharmaceutical interventions for pandemic influenza, national and community measures. *Emerging infectious diseases* [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2006 Jan [cited 2016 Sep 7];12(1):88–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494723>
 20. Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales. UE 6 N°162 - Grippe. In: Alinéa Plus, editor. ECN Pilly. 2016.

-
21. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar P V, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* (New York, NY) [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2005 Oct 7 [cited 2016 Sep 7];310(5745):77–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210530>
 22. Mair CM, Ludwig K, Herrmann A, Sieben C. Receptor binding and pH stability - How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1838(4):1153–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.004>
 23. OMS. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 10]. Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
 24. Yen H-L, Webster RG. Pandemic Influenza as a Current Threat. 2009. p. 3–24. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-92165-3_1
 25. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. 2014;14(5):315–28.
 26. GACHELIN G. JENNER : VACCINATION ANTIVARIOLIQUE - *Encyclopædia Universalis* [Internet]. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/jenner-vaccination-antivariolique/>
 27. Vaccination info. Histoire de la vaccination [Internet]. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <http://www.vaccination-info.be/vaccination-bon-a-savoir/histoire-de-la-vaccination>
 28. Pasteur L (1822-1895). *Oeuvres de Pasteur. Tome VI : Maladies virulentes, virus-vaccins et prophylaxie de la rage* [Internet]. 1933 [cited 2016 Oct 6]. Available from: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k73613>
 29. Institut Pasteur. L'oeuvre de Louis Pasteur | Troisième époque : 1877 - 1887 [Internet]. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/l-histoire/louis-pasteur/l-oeuvre-louis-pasteur/troisieme-epoque-1877-1887>
 30. Soema PC, Kompier R, Amorij J-PP, Kersten GFAA. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2016 Oct 4];94:251–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>

-
31. Ministère de la Santé. Calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2015. *Journal Officiel* [Internet]. 2015;21. Available from: www.sante.gouv.fr
 32. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2011 Aug 8];21(16):1776–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X03000719>
 33. Lee Y-T, Kim K-H, Ko E, Lee Y-N, Kim M, Kwon Y, et al. New vaccines against influenza virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research* [Internet]. 2014;3(1):12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 34. Bonnafous P, Nicolai MC, Taveau JC, Chevalier M, Barrière F, Medina J, et al. Treatment of influenza virus with Beta-propiolactone alters viral membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1838(1 PARTB):355–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.09.021>
 35. Stöhr K, Bucher D, Colgate T, Wood J. Influenza Virus Surveillance, Vaccine Strain Selection, and Manufacture. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2012. p. 147–62. Available from: <http://www.karger.com/globalproxy.cvt.dk/Article/Abstract/197314>
 36. Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal®V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine* [Internet]. 2002 Dec;20(SUPPL. 5):B17–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X02005121>
 37. Partridge J, Kieny MP. Global production capacity of seasonal influenza vaccine in 2011. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;31(5):728–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.111>
 38. Minor P. Assaying the Potency of Influenza Vaccines. *Vaccines*. 2015;3(1):90–104.
 39. Stöhr K. Influenza vaccine production. *Textbook of Influenza* [Internet]. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 352–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118636817.ch23>
 40. Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2002;20(25–26):3165–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163268>

-
41. Thompson CM, Petiot E, Lennaertz A, Henry O, Kamen AA. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology journal* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Jun 11];10:141. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 42. Wood J, Schild G, Newman R, Seagroatt V. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *Journal of Biological Standardization*. 1977;5:237–47.
 43. Rowlen K. Validation of alternative potency assays for influenza vaccines requires clinical studies. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;33(44):6025–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.060>
 44. Tree J a, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* [Internet]. 2001;19(25–26):3444–50. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X01000536>
 45. Lawrence JE, Steward GF. Purification of viruses by centrifugation. *Manual of Aquatic Viral Ecology ASLO*. 2010;2(2):166–81.
 46. Kon TC, Onu A, Berbecila L, Lupulescu E, Ghiorgisor A, Kersten GF, et al. Influenza vaccine manufacturing: Effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PLoS ONE*. 2016;11(3):1–19.
 47. Council of Europe. INFLUENZA VACCINE (SPLIT VIRION , INACTIVATED). 8.0. European pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe; 2008. p. 867–8.
 48. Milián E, Kamen A a. Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines. 2015;2015.
 49. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004;22(11):1393–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15529164
 50. Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines* [Internet]. 2008;7(3):363–71. Available from:

<http://www.expert-reviews.com/doi/pdf/10.1586/14760584.7.3.363>

51. Lambert LC, Fauci AS. Influenza Vaccines for the Future. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2010;363(21):2036–44. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1002842>
52. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert review of vaccines*. 2009;8(12):1681–92.
53. Krammer F, Grabherr R. Alternative influenza vaccines made by insect cells. *Trends in molecular medicine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;16(7):313–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570562>
54. Buckland B, Boulanger R, Fino M, Srivastava I, Holtz K, Khramtsov N, et al. Technology transfer and scale-up of the Flublok(R) recombinant hemagglutinin (HA) influenza vaccine manufacturing process. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;32(42):5496–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.074>
55. Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science (New York, NY)*. 1983;219(4585):632–7.
56. López-Sagasetta J, Malito E, Rappuoli R, Bottomley MJ. Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [Internet]. The Authors; 2016;14:58–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2015.11.001>
57. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller, William J., & Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 1984. p. 178–80.
58. Cox MMJ, Hollister JR. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;37(3):182–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.014>
59. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines* [Internet]. 2010 Oct [cited 2015 Mar 9];9(10):1149–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923267>
60. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014;111(3):425–40.

-
61. Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development and clinical trials. *Human vaccines & immunotherapeutics* [Internet]. 2013 Dec 1;9(12):2505–23. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/vaccines/article/26109/>
 62. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;31(1):58–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
 63. Pulendran B, Maddur MS. Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Current topics in microbiology and immunology* [Internet]. 2014. p. 23–71. Available from: http://link.springer.com/10.1007/82_2014_405
 64. Nicholls JM. The battle between influenza and the innate immune response in the human respiratory tract. *Infection & chemotherapy* [Internet]. 2013;45(1):11–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3780943&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 65. García-Sastre A. Influenza Virus Receptor Specificity. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 2010;176(4):1584–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010604701>
 66. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;12(11):739–49. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro3346>
 67. Eierhoff T, Hrinčius ER, Rescher U, Ludwig S, Ehrhardt C. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathogens*. 2010;6(9).
 68. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011;411(2):229–36.
 69. Samji T. Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2009;82(4):153–9.
 70. Fontana J, Steven AC. Influenza virus-mediated membrane fusion: Structural insights from electron microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;581:86–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.04.011>

-
71. Rossman JS, Leser GP, Lamb RA. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *Journal of virology* [Internet]. 2012;86(20):10950–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3457176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 72. Nayak D, Shivakoti S, Balogun RA, Lee G, Zhou ZH. Structure, disassembly, assembly, and budding of influenza viruses. *Textbook of Influenza* [Internet]. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 35–56. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118636817.ch3>
 73. Martyna A, Rossman J. Alterations of membrane curvature during influenza virus budding. *Biochemical Society transactions* [Internet]. 2014;42(5):1425–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233426>
 74. Hilsch M, Goldenbogen B, Sieben C, H??fer CT, Rabe JP, Klipp E, et al. Influenza a matrix protein m1 multimerizes upon binding to lipid membranes. *Biophysical Journal*. 2014;107(4):912–23.
 75. Chlanda P, Schraidt O, Kummer S, Riches J, Oberwinkler H, Prinz S, et al. Structural analysis of the roles of influenza A virus membrane-associated proteins in assembly and morphology. *Journal of Virology* [Internet]. 2015;89(June):JVI.00592-15. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00592-15>
 76. Gómez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Pérez-Pastrana E, Portela A. Efficient formation of influenza virus-like particles: Dependence on the expression levels of viral proteins. *Journal of General Virology*. 1999;80(7):1635–45.
 77. Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, Vivo a, Portela a. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of virology*. 2000;74(24):11538–47.
 78. Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *Journal of virology*. 2000;74(1):547–51.
 79. Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb R a. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *Journal of virology*. 2007;81(13):7111–23.
 80. Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb R a. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding.

Journal of virology. 2008;82(20):10059–70.

81. Wang D, Harmon A, Jin J, Francis DH, Christopher-Hennings J, Nelson E, et al. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *Journal of virology*. 2010;84(9):4673–81.
82. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;13(8):484–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119571>
83. Haynes JR. Influenza virus-like particle vaccines. *Expert review of vaccines* [Internet]. 2009 Apr;8(4):435–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348559>
84. Li J, Yu M, Zheng W, Liu W. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza a virus proteins. *Viruses*. 2015;7(5):2668–82.

DUROUS Laurent

Etat de l'art des bioprocédés vaccinaux anti-Influenzae et apports de la stratégie des particules pseudo-virales

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2018, 107 p.

RESUME

L'objectif fut de dresser l'état de l'art des réalisations sur les bioprocédés des particules pseudo-virales (PPVs) d'*Influenza* depuis les premières preuves de concept il y a 15 ans de cela. En effet, malgré un certain nombre de revues centrées sur les particularités de la réponse immunitaire engendrée par ce matériel vaccinal, aucune revue n'avait abordé spécifiquement l'aspect bioprocédé des particules pseudo-virales de la grippe.

Dans un premier temps, les caractéristiques du virus *Influenza* sont décrites, sur les plans structural, clinique et épidémiologique. Par la suite sont présentées l'histoire et les évolutions de la vaccination antigrippale, avant de détailler le procédé de production vaccinal traditionnel basé sur l'ovoculture et ses limitations. Puis un aperçu des procédés de production vaccinaux basés sur la culture cellulaire est présenté, afin d'y montrer la place qu'occupe la stratégie de production des particules pseudo-virales.

Après avoir décrit dans un second temps les différents mécanismes à l'œuvre dans le processus d'infection par le virus *Influenza*, il a été étudié les apports du modèle des particules pseudo-virales d'*Influenza* dans les études structurales de caractérisation du processus de bourgeonnement viral en cellules mammifères.

La troisième partie de cette thèse est une revue scientifique sur les bioprocédés des particules pseudo-virales d'*Influenza*. Basée sur les résultats issus de plus de 70 articles scientifiques, elle détaille les procédés de production sur trois plateformes cellulaires et les quatre types de stratégies développées à l'heure actuelle pour la production des particules pseudo-virales d'*Influenza*, mais également les procédés de purification et les perspectives entrevues pour cette stratégie concernant l'évolution des procédés de vaccin *Influenza*.

MOTS CLES

Influenza, Vaccin, Particules Pseudo-virales

JURY

Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine, Professeur

M. PAILLER-MATTEI Cyril, Professeur

M. CONDRUZ Stefan, Pharmacien-Ingénieur

Mme PETIOT Emma, Enseignant-Chercheur

DATE DE SOUTENANCE

Mercredi 5 septembre 2018

ADRESSE DE L'AUTEUR

46, Rue Jules Brunard – 69007 LYON