



Développement d'une nouvelle technique bioanalytique basée sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface pour le suivi en-ligne de virus influenza dans les bioprocédés vaccinaux

Laurent Durous

► To cite this version:

Laurent Durous. Développement d'une nouvelle technique bioanalytique basée sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface pour le suivi en-ligne de virus influenza dans les bioprocédés vaccinaux. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1068 . tel-03339938

HAL Id: tel-03339938

<https://theses.hal.science/tel-03339938>

Submitted on 9 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1068

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 24/04/2020, par :

Laurent Durous

Développement d'une nouvelle technique bioanalytique basée sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface pour le suivi en-ligne de virus influenza dans les bioprocédés vaccinaux

Devant le jury composé de :

Isabelle Legastelois	Responsable scientifique, Sanofi Pasteur	Rapporteure
Patrice Marche	Directeur de recherche, INSERM	Rapporteur
Loïc J. Blum	Professeur des universités, UCBL	Président
Nathalie Vollmer	Spécialiste produit, Horiba	Examinatrice
Christophe Marquette	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse
Emma Petiot	Chercheure, CPE Lyon	Co-directrice de thèse
Manuel Rosa-Calatrava	Directeur de recherche, INSERM	Invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements

Avant toute chose, je souhaite remercier profondément Emma, Christophe et Manuel qui m'ont encadré et fait confiance durant ce travail de thèse. Merci de m'avoir permis de mener ce projet avec une grande liberté à l'interface de vos trois expertises.

Un grand merci aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ces travaux et d'accepter de réaliser cette soutenance un peu particulière par visioconférence.

Un grand merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse.

Aux amis du labo et toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de cette thèse

Au Pr Loïc Blum, pour sa confiance accordée de m'avoir accepté dans son laboratoire et les bons souvenirs d'ASCOS !

Au « noyau dur » de la MDH : Chloé (#collègue de bureau), Léa, Pierre et Yani, petits anges partis trop tôt, qui m'ont inclus dans leur cercle biochimique.

Aux nouvelles graines de la MDH : Julien, pour ta verve inégalée, après tous ces prix gagnés la soutenance ne sera qu'une formalité ! Chloé, toujours la bonne humeur ! Clément, Nicolas, Hema, Thomas, Sébastien, Lucas, Ala, Laetitia, Laura et tous les autres.

À Béa, pour ta joie de vivre et ton art de taquiner les thésards et étudiants du labo, c'était un plaisir d'embêter tes étudiants. Happy Friday day !

Également à Bastien, Agnès, Ofélia, Guillaume, Marjorie, Agnès, merci pour votre aide et bienveillance.

Thomas, la preuve vivante qu'on peut être à la fois un expert international en génétique inverse et en analyse footballistique. C'était un vrai plaisir d'être ton coéquipier de bureau et te poser des questions tordues auxquelles tu as toujours pris le temps de répondre !

Aurélien, lab manager rêvé ! Pro des titres HA, SRID et autres, merci beaucoup pour ton aide.

Blandine, toujours la pêche. Courage pour ta thèse mais ça me semble plutôt bien parti !

Julia, merci pour le cours d'initiation au taekwondo et courage avec les bioréacteurs, tu seras bientôt une pro !

A la team bioinfo : Claire (parce qu'on était tous les deux dans la même galère) et Julien, à notre prochaine cervoise j'espère !

Olivier, merci pour tes conseils et remarques toujours pertinentes et ton sens de la rigueur, tu es un vrai exemple de chercheur !

Manuel, pour toujours savoir comment pousser ton équipe et être ouvert au pharmaciens et leurs montages en tuyaux farfelus dans le labo !

Un grand merci également à tous les autres : Andrès, Paul, Anaïs, Pauline, Léa, Caroline, Victoria... Merci de votre aide et m'avoir accepté à la table de Virpath pour ces lunchs du midi, c'était un plaisir !

A tous ceux que j'ai pu oublier ici et qui m'ont aidé et soutenu !

À mes amis d'enfance, des bancs de la fac et des sorties en montagne

A la bande de champions du lycée pour être toujours là après toutes ces années : Cynthia et Nicolas, Sarah, Ali et Marion, Valentine, Adrien, Arnaud et Shabnam, Margot et Xavier, Julie, Marine et Pierre.

A mes amis de Montréal, et d'après ! Coline et Vincent, Camille et Stefan. A notre prochain bivouac ! ;)

À Stefan, solide directeur de thèse de pharma, compagnon de footing et des soirs de matchs ! ;)

Aux amis des bancs de la fac de pharma : Myriam, Erwan, Paul, Olivier, Matthieu, Charlélie, Eric...

À la fameuse team choco : Vincent, Margaux, Mat, Guillaume, Charlotte, Maxime, Max, Camille, Stacy, Alban. Il reste encore un bon nombre de 4000, de vols et de couloirs à faire ensemble !

À ma famille

A mes parents, soutien indéfectible durant ces (*très*) longues années d'études.

Vincent, Margaux, Gaspard & Octave, j'espère venir vous voir souvent dans votre nid annecien !

Audrey, à ton tour bientôt ! ;) Hâte de venir te voir à Lille !

Finalement

A la SPR, pour avoir tenu le coup après s'être fait ouvrir le ventre à de nombreuses reprises...robuste la bête !

À toi, petit thésard à qui peut-être ces quelques lignes t'aideront à éclaircir un peu tes idées comme d'autres ont pu éclaircir les miennes

Table des matières

I.....	
LE VIRUS INFLUENZA ET LES BIOPROCEDES DE PRODUCTION DE VACCIN INFLUENZA.....	1
I.1. Le virus Influenza	1
I.1.1. Les glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine et la neuraminidase	2
I.2. La vaccination antigrippale	3
I.2.1. Les mécanismes évolutifs du virus <i>Influenza</i>	3
I.2.2. Principe de la vaccination.....	4
I.3. Les vaccins anti-influenza	4
I.3.1. Evolution de la composition vaccinale.....	4
I.3.2. Les différents types de vaccins influenza	5
I.4. Les procédés de production d'antigènes vaccinaux d'influenza	7
I.4.1. Le procédé basé sur l'ovoculture.....	7
I.4.2. Les procédés alternatifs basés sur la culture cellulaire	9
II.....	
L'EVALUATION DES PRODUCTIONS VACCINALES D'INFLUENZA : PRINCIPES ET TESTS	
ANALYTIQUES ASSOCIES.....	14
II.1. En aval du procédé - les critères réglementaires pour la libération des lots de vaccin	15
II.1.1. L'activité vaccinale.....	15
II.1.2. De l'efficacité à l'activité vaccinale.....	16
II.1.3. Dosage d'activité : Le cas du vaccin anti-Influenza	17
II.1.3.1. Le dosage d'activité hémagglutinante.....	17
II.1.3.2. Le dosage d'activité neuraminidase.....	18
II.1.3.3. Le dosage d'activité par SRID : principe et limitations	19
II.1.3.4. Les techniques analytiques alternatives	23
II.1.3.4.1. Les techniques analytiques physicochimiques	24
II.1.3.4.2. Les techniques basées sur l'affinité.....	27
II.2. Au cours du procédé – La stratégie <i>Process Analytical Technology</i>	31
II.2.1. L'application de la stratégie PAT dans les bioprocédés de production virale d'influenza.....	33
II.2.2. Les techniques analytiques pour la quantification de particules virales in-process.....	36
II.2.3. Comparatifs des techniques analytiques utilisées pour la quantification de particules virales.....	39
III.....	
BIOPUCES ET BIOCAPTEURS BASÉS SUR LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE : PRINCIPES	
ET APPLICATIONS À L'ANALYSE DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES ET À L'ANALYSE QUANTITATIVE	
D'ANTIGÈNES ET DE PARTICULES VIRALES EN SOLUTION	42
III.1. Définition du biocapteur.....	43

Table des matières

III.2.	Biocapteurs par résonance plasmonique de surface.....	45
III.3.	Les biopuces.....	47
III.3.1.	Définition.....	47
III.3.2.	Stratégies d'immobilisation et architectures utilisées.....	48
III.3.2.1.	Techniques de dépôt.....	48
III.3.2.2.	Stratégies d'immobilisation	48
III.3.2.3.	Architectures utilisées pour les biocapteurs SPR.....	51
III.4.	Biopuces et biocapteurs utilisés pour l'analyse cinétique et quantitative d'Influenza.....	52
III.4.1.	Analyse cinétique des interactions hémagglutinine-glycanes.....	52
III.4.1.1.	Importance des interactions protéines-glycanes dans les interactions virus-hôte.....	52
III.4.1.2.	Relation structure-activité.....	53
III.4.2.	Analyse quantitative de l'hémagglutinine sous forme trimérique et impact de la valence.....	56
III.4.3.	Des tests biologiques aux biocapteurs digitaux : nouveaux outils pour la compréhension mécanistique de l'association du virus influenza à des surfaces et la quantification de virus.....	57
III.5.	Application de la SPR à l'analyse quantitative	59
III.5.1.	Modèle d'interaction avec limitation par le transfert de masse	59
III.5.2.	Application du modèle à l'analyse SPR quantitative.....	62
III.5.3.	Applications de la SPR quantitative au suivi de bioprocédés et au dosage d'activité vaccinale	63
IV.		
OBJECTIFS.....		66
V.		
MATERIELS & METHODES.....		72
V.1.	Tables des produits et matériel utilisés.....	73
V.2.	Production de matériel viral de référence	77
V.3.	Purification de matériel issu de culture cellulaire	79
V.4.	Biocapteurs d'imagerie par résonance plasmonique de surface.....	82
V.4.1.	Appareils et calibration.....	82
V.5.	Ligands et méthodes d'immobilisation	85
V.5.1.	Fonctionnalisation des puces SPRi sur l'appareil SPR-2	85
V.5.2.	Immobilisation de ligands sur biopuce SPR multiplexée.....	87
V.5.2.1.	Automate de dépôt.....	87
V.5.2.2.	Traitement des prismes	87
V.5.2.3.	Stratégie de fonctionnalisation des biopuces.....	87
V.6.	Analyse d'hémagglutinine et de virus Influenza par SPRi quantitative simplex	90
V.6.1.	Conditions d'analyse	90
V.7.	Autres méthodes analytiques.....	90
V.7.1.	Quantification des protéines totales.....	90

Table des matières

V.7.2.	Titrages infectieux.....	91
V.7.2.1.	Méthode des plages de lyse.....	91
V.7.2.2.	Méthode de la Dose Infectante en Culture Tissulaire 50% (DICT ₅₀).....	92
V.7.3.	Dosages d'activité.....	92
V.7.3.1.	Immunodiffusion radiale.....	92
V.7.3.2.	Dosage d'activité hémagglutinante	93
V.7.3.3.	Dosage d'activité neuraminidase	94
V.7.4.	Densitométrie	94
V.7.5.	Analyse des particules totales.....	95
V.8.	Montage réalisé pour le suivi <i>en-ligne</i>	95
V.8.1.	Réacteur de production virale.....	96
V.8.2.	Filtration acoustique	97
V.8.3.	Interfaces électroniques et communications.....	97
V.8.4.	Filtration tangentielle automatisée.....	100
VI.		
DEVELOPPEMENT D'UN TEST SPRI QUANTITATIF POUR LE SUIVI DES PRODUCTION VACCINALES D'INFLUENZA.....		102
VI.1.	Introduction.....	103
VI.2.	Manuscrit	104
VI.3.	Résultats complémentaires, conclusions et perspectives.....	111
VI.3.1.	Le choix du ligand utilisé	112
VI.4.	Les conditions d'analyse.....	113
VI.5.	Le traitement du signal SPRI	115
VI.5.1.	Evaluation du signal non-spécifique.....	115
VI.5.2.	Référencement des sensorgrames et détermination du k_t	116
VI.6.	Les performances analytiques	119
VI.6.1.	Dosage d'activité vaccinale.....	119
VI.6.2.	Analyse quantitative de particules virales entières.....	120
VI.7.	L'évaluation préliminaire de constantes cinétiques	121
VI.8.	Evaluation des cinétiques de production virale en culture cellulaire	122
VII.		
DÉVELOPPEMENT DE BIOPUCES SPRI MULTIPLÉXÉES POUR L'ANALYSE QUALITATIVE DES BIOPROCÉDÉS DE PRODUCTION DE VACCIN INFLUENZA.....		124
VII.1.	Introduction	125
VII.2.	Développement de biopuces multiplexées pour l'évaluation de paramètres de qualité des productions d'antigènes vaccinaux d'influenza.....	125
VII.3.	Conformation des antigènes vaccinaux et évaluation de l'avidité	126
VII.4.	Contaminants issus de la culture cellulaire.....	127

VII.5. Biopuce SPRi multiplexée pour la caractérisation des relations structure activité entre l'hémagglutinine virale et les glycanes	128
VII.5.1. Réalisation de la biopuce multiplexée et des analyses.....	128
VII.5.2. Résultats et conclusions.....	129
VII.5.3. Perspectives	132
VII.6. Biopuce SPRi pour l'analyse de vésicules extracellulaires.....	134
VII.6.1. Production d'un lot de virus influenza H1N1 concentré et purifié	135
VII.6.1. Production d'un lot de vésicules extracellulaire concentrées et purifiées	136
VII.6.2. Réalisation de la biopuce.....	138
VII.6.3. Résultats analytiques.....	139
VII.6.4. Conclusions et perspectives	140
VIII.	
DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION D'UN DISPOSITIF SPRi EN-LIGNE POUR L'ÉVALUATION DES CINÉTIQUES DE PRODUCTION VIRALES	142
VIII.1. Introduction	143
VIII.2. Manuscrit	144
VIII.3. Développement d'un dispositif de filtration tangentielle automatisée.....	159
VIII.4. Conclusions générales et perspectives	162
IX.	
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	166
X.....	
ANNEXES	172
XI.	
BIBLIOGRAPHIE	188

Table des figures

Figure 1 : Structure du virus influenza A. A partir de (3).	1
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 structure protéiques obtenues par cristallographie aux rayons X. Tiré de (5).	2
Figure 3 : Evolution du vaccin en fonction de l'évolution des souches circulantes depuis 1933. Tiré de (13).....	4
Figure 4 : Composition des différents types de vaccins influenza. A partir de (12).....	5
Figure 5 : Eventail des nouvelles stratégies vaccinales basées sur le génie génétique.	6
Figure 6 : Procédés de production et de purification de lots de vaccin Influenzae monovalents. A partir de (19)	7
Figure 7 : Evolution des lignées cellulaires et des plateformes de production développées pour la production virale et place de la stratégie Process Analytical Technology.....	10
Figure 8 : A/ Relation entre les titres d'inhibition de l'activité hémagglutinante post-vaccination et le pourcentage d'infection observé pour différentes souches virales. Tiré de (45). B/ Impact de différents traitements dénaturants sur l'immunogénicité de vaccin Influenza, évaluée par mesure des titres HI chez la souris. GMT = Geometric Mean Titer. Tiré de (46)	16
Figure 9 : Relations entre le degré de variabilité attendu et la facilité d'évaluation de l'activité des lots de vaccins selon le type de tests biologiques. Tiré de (52)	17
Figure 10 : Principe des dosages d'activité hémagglutinante (A,B) et d'inhibition d'activité hémagglutinante (C).	18
Figure 11 : Principe du dosage d'activité neuraminidase à l'aide de substrat MUNANA.	19
Figure 12 : Principe du dosage des antigènes d'hémagglutinine par la technique d'immunodiffusion radiale	20
Figure 13 : Etapes principales du processus de standardisation des lots de vaccins monovalents.....	21
Figure 14 : Corrélations obtenues par Ennis et al. (1977) entre le degré de séroconversion et l'activité vaccinale mesurée par SRID ou hémagglutination (CCA = Chicken Cell agglutination). Tiré de (33) d'après (66).	23
Figure 15 : Chromatogramme RP-HPLC obtenu lors de l'analyse d'un vaccin trivalent. Les pics de HA1 issus de B/Malaysia/2506/2004, A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), et A/New Caledonia/20/99 (H1N1) sont élués à 3,2, 3,7 et 4,8 min. Tiré de (78).....	25
Figure 16 : Evaluation par spectrométrie de masse de la quantité de HA contenue dans plusieurs vaccins trivalents (tri-1 à tri-4) et dans les lots d'antigènes de référence (RA) pour les trois souches. Tiré de (89)	26
Figure 17 : Evaluation des titres relatifs d'activité observés pour du vaccin en fonction du traitement de l'échantillon pour la SRID(A), la SDS-PAGE (B) et la RP-HPLC (C). Tiré de (46)	27
Figure 18 : Conformations structurales de la protéine HA adoptées lors de sa dénaturation. Le peptide de fusion de la HA est ciblé par les anticorps universels développées par Li et al. et Manceur et al.. Tiré de (100)	28

Figure 19 : Gauche : Corrélations entre le titre d'inhibition d'hémagglutination et l'activité vaccinale évaluée en μg HA/mL par SRID et Vaxarray Droite : Courbes de calibration entre la concentration en HA évaluée par SRID (abscisse) ou test vaxarray (ordonnée) pour un lot de vaccin monovalent et un réactif « interne ». Tiré de (101) ...	28
Figure 20 : Les différents types de stratégie de suivi de procédé. A partir de (107).....	34
Figure 21 : Cinétique de production virale lors d'une culture t_i : temps d'infection ; t_p : temps de début de production	34
Figure 22 : Cinétiques de production hors-ligne de virus H1N1 A/PR8/34 Gauche : en cellules MDCK (MOI = 0,00025) évaluée par dosages d'activité HA ($\blacktriangle$), NA ($\circ$) et d'infectivité (*). Tiré de (57); Droite : en cellules AGE1.CR en suspension en mode continu évaluée par dosages d'activité HA ($\bullet$) et d'infectivité ($\blacktriangle$). Tiré de (112).	35
Figure 23 : Evaluations comparatives de différentes techniques pour la quantification des particules virales infectieuses ou totales. Données tirées de : A (125), B (55) EID ₅₀ : Titrage par méthode de la dose infectieuse pour 50% des cultures en œuf embryonné ; BPL : β -propiolactone ; FFA : Fluorescence focusing assay (voir Tableau 8) ; AUC-SV : Ultracentrifugation analytique.	40
Figure 24 : Représentation schématique des composants d'un biocapteur. A partir de (127).....	43
Figure 25 : Onde plasmonique de surface générée à l'interface métal-diélectrique et composantes transversales (Lx) et longitudinales (Lz). E : champ électrique. Tiré de (136).....	45
Figure 26 : Représentation schématique de capteurs SPR (A) et d'imagerie SPR (B) selon la configuration de Kretschman. Bas : modes d'interrogation classique des capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface. ① Interrogation d'intensité à angle fixe ② Interrogation angulaire de l'angle critique.....	46
Figure 27 : Techniques de dépôts utilisées pour la fabrication de biopuces A/ Dépôt en mode contact B/ Dépôt en mode sans contact selon la méthode « jet d'encre » C/ Dépôt en flux continu	48
Figure 28 : Exemples de stratégies d'immobilisation utilisées pour la réalisation de biocapteurs et biopuces.....	50
Figure 29 : Architectures utilisées pour la réalisation de tests bioanalytiques SPR (gauche) et types de dosages quantitatifs (droite). A/Immuno-essais réalisés en mode direct et sandwich pour l'analyse d'antigène et d'anticorps B/ Types d'immuno-essais et méthodes d'amplification développées pour les biocapteurs basés sur la SPR. Droite : tests quantitatifs direct et indirect développés pour l'analyse de HA (102,157).	51
Figure 30 : Interactions multivalentes glycanes-protéines entre les particules virales et les récepteurs présents au niveau de la membrane cellulaire. Gauche : Interactions entre le virus Influenza et les glycoprotéines membranaires de l'hôte. Droite : Interactions entre les glycanes exposés à la surface du virus et les protéines se liants aux glycanes (GBP) présents au niveau de la membrane (Tiré de (158)).	53
Figure 31 : Evolution des technologies dédiées à l'analyse de virus influenza et basées sur l'interaction virus-glycanes. Sources : (53,163–169).....	53
Figure 32 : Evaluation de la spécificité de l'hémagglutinine pour un éventail de glycanes présentant une extrémité terminale de type acide sialique par biopuces à glycanes. Résultats obtenus pour différentes souches : souche pandémique humaine (A/South Carolina/1/1918) et souche aviaire (A/Duck/Ukraine/1/1963). Tiré de (142).....	54

Figure 33 : Ordres de grandeurs de la constante de dissociation apparente (hormis pour HA-glycane monovalent > Kd) évaluée pour différentes interactions biologiques HA-ligand ou virus-ligand. Source : (171)	56
Figure 34 : Importance de la valence antigénique/du degré d'oligomérisation pour le développement de dosages d'activités. A/ Profils d'élutions obtenus par chromatographie d'exclusion lors de l'analyse de vaccin H5N1 et de HA recombinante (rHA1) B/Sensorgrames obtenus lors de l'analyse SPR des fractions issues de la séparation d'échantillon de HA recombinante (mono-, tri- et oligomère) et de vaccin H5N1 à 10µg HA/mL. Tiré de (65)	57
Figure 35 : Evolution des techniques analytiques dédiées à la quantification de particules virales uniques. Sources : (121,123,182,191–193)	58
Figure 36 : Représentation schématique des phénomènes de transferts et d'interaction se déroulant pour un biocapteur de surface (système hétérogène liquide-solide). A : Concentration d'analyte ; B : densité surfacique de ligand ; δ : épaisseur de la couche de diffusion limite ; h : hauteur de la cellule fluïdique ; l : longueur de la surface d'immobilisation du ligand	60
Figure 37 : Détails des paramètres constitutifs du coefficient de transport k_t . MW : poids moléculaire de l'analyte, D : coefficient de diffusion de l'analyte, G : facteur de conversion entre la densité surfacique d'analyte et le signal obtenu en RU. Voir (195,197) pour le détail.	63
Figure 38 : Application de l'analyse SPR quantitative au suivi en-ligne de production d'anticorps. Gauche : sensorgrames ; Milieu : calibrations entre la concentration bioactive d'anticorps évaluée par HPLC et le taux d'association initiale évalué par SPR (RU/s). Droite : comparaison des analyses hors- (densitométrie ou HPLC) et en-ligne (CFCA). Tiré de (201,202).....	64
Figure 39 : Application de la résonance plasmonique de surface au développement des bioprocédés vaccinaux anti-Influenza. Les domaines d'application directe de la technique SPR pour le développement et/ou la caractérisation des productions vaccinales sont indiqués dans des cadres rouge.....	68
Figure 40 : Etapes du développement d'un outil analytique pour la quantification en-ligne de particules virales...70	70
Figure 41 : Techniques utilisées à échelle du laboratoire pour la purification de particules virales. A/ Ultracentrifugation. B/ Filtration tangentielle C/ Chromatographie d'exclusion par la taille sur colonne.....	79
Figure 42 : A/Séquence de purification mise en place pour l'obtention d'échantillons de particules virales hautement purifiées. B/ Etapes de séparation basée sur la centrifugation pour la clarification (❶) et la séparation virus-contaminants sur coussin (❷) et gradient (❸) de densité et photographies correspondantes (la flèche blanche indique la bande où est retrouvé le virus). C/Validation de l'obtention d'un gradient de densité à l'aide de l'appareil Gradient Master par lecture de l'indice de réfraction après recueil des fractions.	80
Figure 43 : Composantes des appareils de résonance plasmonique de surface A/ Appareil Sierra sensors SPR2 B/Schéma du dispositif C/Cellule fluïdique (flèches grise : flux de solution tampon, flèche blanche : flux d'analyte D/ Appareil SPRI-lab+ (Horiba-Genoptics) E/ Schéma du dispositif, tiré de (138).....	82
Figure 44 : A/Courbes de réflectivité en fonction de l'angle incident d'illumination du prisme, obtenues pour 20 zones d'intérêt sur le système SPRI-lab+ B/Dérivée première des courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence.....	83

Figure 45 : A/Image SPR d'une biopuce fonctionnalisée par différents ligands suivant une grille de dépôt de 6*7 plots. B/ Sensorgrammes obtenus pour les différentes aires d'intérêt définies par l'utilisateur lors de la calibration du système par l'injection d'une solution d'indice de réfraction supérieur à la solution tampon circulante.....	84
Figure 46 : Calibration de l'appareil SPR-2. A/Sensorgrammes obtenus lors du passage de solutions de glycérol de concentrations croissantes B/ Courbes de calibrations obtenues à partir de la variation de signal ΔRU relevée en fonction de l'incrément d'indice de réfraction des solutions de glycérol injectées (Fc_1 and Fc_2, n=4).....	85
Figure 47 : Séquence de fonctionnalisation en flux des puces SPR-2. EDC/NHS : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide / N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS, 0,2/0,05 M) ; NA : neuraminidase bactérienne de C. perfringens	85
Figure 48 : Traitement de la surface de référence du capteur SPRi fonctionnalisé par la neuraminidase bactérienne de C. perfringens (2,5 U/mL) A/Surface de référence (gris) et surface de détection (rouge) B/Variation du signal SPRi (ΔRU) obtenue lors de l'injection de solution de neuraminidase bactérienne sur la surface de référence (Fc_2)	86
Figure 49 : Dépôt automatisé de ligand à la surface de prismes. A/ Automate de dépôt Scienion Sciflexarrayer S3 B/ Capillaire et élément de transduction piézoélectrique (gris) permettant le dépôt à la demande de gouttes de volume définit C/ Prisme SPRi (9*9 spots) obtenu après immobilisation de glycanes par dépôt automatisé.....	87
Figure 50 : Stratégie de fonctionnalisation en plusieurs étapes des biopuces SPRi du système Horiba-genoptics....	88
Figure 51 : Stratégie de greffage covalent par 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) sur monocouche d'acide α -lipoïque utilisée pour fonctionnaliser les biopuces. Protocole issu de (151)..	88
Figure 52 : Grille de dépôt de 6*7 plots utilisée pour l'immobilisation de ligand sur les biopuces SPRi.	89
Figure 53 : Effet cytopathique du virus influenza sur cellules adhérentes MDCK. A/Monocouche ou tapis de cellules MDCK saines à confluence ; B/ Observation d'un effet cytopathique (ECP) C/ Destruction du tapis cellulaire.....	91
Figure 54 : A/ Automate de lecture (Protocol 3, Symbiosis) B/ Gel de SRID.....	93
Figure 55 : Lecture du titre en activité hémagglutinante.....	94
Figure 56 : Montage réalisé pour le suivi en-ligne de production de virus Influenza issu de culture cellulaire en suspension. A/ Diagramme du procédé ; AF : Filtre à air 0,22 μ m; PP: Pompe péristaltique ; CV : Valve anti-retour; SP : Pompe à seringue; μ C : microcontrôleur. B/ Photographie du système de prélèvement et d'analyse en ligne. ...	96
Figure 57 : Cultures de cellules en suspension T-17 réalisées en : A/ Flacons rotatifs placés dans un incubateur agité (ISF1-X, Khüner) B/Bioréacteur (Spinner flask 500 mL - Bellco) utilisé pour le suivi en-ligne de production de virus Influenza.	96
Figure 58 : Dispositif de filtration acoustique (Applikon Biosep) A/ Composantes du système B/Connections entrées-sorties du système, tiré de (212) C/ Principe de la technique de séparation par filtration acoustique, les cellules s'agglomèrent au niveau des nœuds de basse pression.....	97
Figure 59 : Boîtier électronique comprenant le microcontrôleur, la valve solénoïde SV-1 et le capteur air/liquide à ultrasons US-1.....	98

Figure 60 : Montage de filtration tangentielle automatisée réalisé A/Schémas descriptifs de la filtration tangentielle en mode « manuel » basée sur un module Microkros (rouge : échantillon/rétentat, bleu : filtrat) B/ Schéma du montage réalisé pour l'évaluation de la filtration tangentielle automatisée, l'échantillon se retrouve initialement dans la boucle de la valve HPLC-V1 C/Photographie du montage : ❶ Entrée de l'échantillon présent dans la boucle HPLC ❷ Entrée du tampon de diafiltration ❸ Sortie du rétentat vers la valve d'échantillonnage de la SPR ❹ Sortie du filtrat vers les déchets liquides.....	101
Figure 61 : A/ Régénérations multiples du biocapteur avec une solution de SDS 0,25% v/v lors de l'analyse de vaccin Influenza à une concentration de 10 µg HA.mL ⁻¹ B/ Evaluation de différentes solutions de régénération sur le signal SPRi (25µL, 1 min) : le % de diminution du signal correspond au % de retour à la ligne de base (flèche noire A/) obtenu lors de l'injection de la solution de régénération après injection de vaccin trivalent à une concentration de 10 µg HA.mL ⁻¹ (n=3).....	113
Figure 62 : Evaluation de l'influence de l'ajout de carboxylate d'oseltamivir (OC) sur la réponse lors de l'analyse de virus entier. A/Sensorgrammes obtenus lors de l'analyse de virus H1N1 (souche H1N1 A/X-179A – 1.10 ⁸ DICT ₅₀ /mL – 10µL/min – 25°C – double référencement – 4 dilutions en série) avec ou sans ajout d'OC à 10 µM final B/ Evaluation de l'impact de l'OC sur la réponse sur la base du taux d'association, la pente de la courbe de calibration correspond à k _t (voir VI.5) évaluée entre t=0 et la fin de la phase d'association (t=180s).	115
Figure 63 : Réponse obtenue (double référencement) lors de l'analyse de différents tampons/milieus de culture.	116
Figure 64 : Triple référencement du signal SPRi pour l'évaluation des interactions spécifiques entre les particules virales d'Influenza et les surfaces présentant des glycanes avec des extrémités terminales acides sialiques. A/ Sensorgrammes obtenus (1 ^o référencement) lors de l'analyse d'échantillons de surnageant de culture MDCK infectée (trait plein) ou non (Mock, pointillé) à 48 h.p.i. (OC 10 µM, débit = 5µL/min, tampon PBS-T 0,005% v/v, 15°C) B/ Sensorgrammes obtenus après double référencement des analyses SPRi par soustraction des signaux Fc2-Fc1.....	117
Figure 65 : A/ Corrélation entre le taux d'association initiale évalué directement sur les sensorgrammes référencés et le taux calculé par l'équation 6.1 B/Courbes de calibration obtenues pour l'analyse de virus Influenza (A/X-179A – MDCK) à différents débits.	118
Figure 66 : A. Evaluation des cinétiques de production virale en culture de cellules MDCK par dosage d'infectivité PFU et SPRi. B. Corrélation obtenue (graphique Log-Log) entre la réponse SPRi et les titres en particules infectieuses jusqu'à (rouge) et après (noir) 48 h. post-infection (n=3 pour les analyses SPRi et n=2 pour les analyses PFU) C. Evaluation de la cinétique par immunomarquage anti-HA.....	123
Figure 67 : A/ Représentation schématique d'une vésicule extracellulaire de type exosome B/Echantillons issus de productions de particules pseudo-virales (VLPs) d'Influenza en modèle cellulaire HEK293-SF purifiés sur coussin de sucrose. Flèches noires : VLPs ; Flèches blanches : VEs. Tiré de (223,224)	127
Figure 68 : A/ Liste des différents plots de ligands immobilisés sur la biopuce SPRi à glycanes multiplexée B/ Plan de dépôt de la biopuce (7*8 plots) et image SPRi correspondante. PA : polymère glycane : polyacrylamide 30 kDa : biotine, B : glycane biotinylé	129

Figure 69 : Evaluation des paramètres analytiques de la réponse SPRi sur biopuce à glycanes multiplexée lors de l'analyse de vaccin trivalent (Vaxigrip 2017-2018). A/Impact de la densité surfacique de fétuine sur la réponse évaluée à l'équilibre B/Courbes concentration-réponse évaluées pour différents ligands : fétuine et glycanes multivalents C/ Evaluation de la relation entre la densité surfacique relative de fétuine et la fraction saturante f ($n=2$) D/ Impact de la densité surfacique de fétuine sur la réponse suivant le taux d'association initiale.	130
Figure 70 : Purification de virus Influenza (A/H1N1/California/07/2009) par chromatographie d'affinité sur colonne Fétuine-Agarose. A/ Chromatogrammes obtenus selon les titres en particules virales infectieuses ($\text{DICT}_{50}.\text{mL}^{-1}$) et les concentrations en protéines totales évalués par dosage BCA en fonction du volume élué B/Analyse par immunomarquage (anti-HA) des fractions récoltées au volume d'élution correspondant.	136
Figure 71 : A. Profil d'élution obtenu par dosage des protéines totales (BCA) lors de la purification d'échantillons de VEs sur colonne SEC IZON qEV, le cadre rouge indique les fractions collectées qui ont été rassemblées et analysées par TRPS. B. Analyse de la population de VEs purifiée par TRPS.	137
Figure 72 : A/ Liste des différents plots de ligands immobilisés sur la biopuce SPRi multiplexée pour l'analyse de VEs B/ Plan de dépôt de la biopuce (7*7 plots) et image SPRi correspondante.....	138
Figure 73 : Analyse SPRi des échantillons de vésicules extracellulaires purifiées lysées au détergent (BRIJ 0,5%) Sensorgrammes référencés (Signal – Signal plot « contrôle » pour la surface d'or) obtenus pour différents ligands lors de l'analyse SPRi d'échantillons de VEs traités au détergent (traits pleins) et détergent seul (traits pointillés).....	139
Figure 74 : Dispositif automatisé pour le suivi en ligne de production virale. A/ Diagramme du procédé et d'instrumentation (P&ID). AF : filtre 0,22 μm ; PP: pompe péristaltique; CV : valve anti-retour; US : capteur air/liquide; SV : valve solénoïde 3 voies; SP : pompe à seringue; μC : microcontrôleur. B/ Photographie du dispositif.	160
Figure 75 : A/Evaluation des performances de diafiltration du système de filtration tangentielle automatisé suivant le nombre de cycles d'ultrafiltration/diafiltration avec du milieu de culture Optipro; B/ Calibrations réalisées pour l'analyse SPRi de surnageants de culture T-17 (virus A/H1N1/California/07/2009) avant et après filtration manuelle avec un facteur de concentration volumique $\text{VCF}=100$	161
Figure 76 : Représentation des différentes phases d'une analyse SPR(i). Tiré de (147).....	174
Figure 77 : A/ Calibration entre la variation du signal SPR observé et la densité surfacique réalisée à partir de différentes protéines radiomarquées (^{14}C -chymotrypsinogen, ^{14}C -transferrine et ^{35}S -anticorps monoclonal anti-transferrine) (259) B/ Evaluation de la réponse SPR obtenue lors de l'association de NeutAvidin à une monocouche auto-assemblée de biotine à deux débits différents.	176
Figure 78 : Application de l'analyse SPR au dosage d'activité. Gauche : Evaluation de l'activité relative à l'aide de différentes techniques : ratio des pentes(A), EC_{50} (B) et PLA (C) ; Droite : dosages B/ Tiré de (234)	177

Table des tableaux

Tableau 1 : Critères d'évaluation des lots de vaccin monovalents produits par ovoculture. Les références des méthodes à appliquer selon la Pharmacopée Européenne (EP) 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 Kon et al. (20).....	8
Tableau 2 : Lignées cellulaires utilisées pour la production de virus Influenza en culture cellulaire (21,22).....	11
Tableau 3 : Liste des vaccins antigrippaux commercialisés produits par culture cellulaire.	12
Tableau 4 : Avantages et limitations du dosage d'activité par SRID. A partir de (61) et (51)	22
Tableau 5 : Comparatifs des différentes techniques analytiques alternatives à la SRID développées pour la quantification de l'hémagglutinine virale d'influenzae. N.C. : non communiqué. LTD : Limited trypsin digestion ou digestion limitée par la trypsine = étape de pré-digestion sélective de la HA dénaturée.....	29
Tableau 6 : Définition des paramètres de la stratégie Quality by Design et PAT selon les recommandations du conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH)	31
Tableau 7 : Étapes à suivre dans la mise en place de la stratégie PAT pour le suivi analytique in-process.....	32
Tableau 8 : Techniques analytiques utilisées pour la quantification des particules virales d'influenza. A partir de (60,114).	38
Tableau 9 : Evaluation du ratio entre particules virales « totales » et particules infectieuses pour le virus influenza	39
Tableau 10 : Attributs de la particule virale évalués par les différentes techniques analytiques. N.E. : Non évaluée. *Des réactifs permettant un immunomarquage de l'hémagglutinine sont en cours de développement	41
Tableau 11 : Éléments de reconnaissance et exemples de techniques développées dans le champ de recherche des biocapteurs.	44
Tableau 12 : Constantes de dissociation de complexe HA – Sialyl-N-acetyllactosamine (SLN) avec une liaison terminale α 2,3- ou α 2,6- évaluées en solution par différentes méthodes (RMN, dosage SPR indirect).....	55
Tableau 13 : Simplifications du modèle de réaction-diffusion surfacique et équations correspondantes. Q : débit...61	61
Tableau 14 : Table des matières premières et réactifs utilisés	73
Tableau 15 : Liste des milieux de culture utilisés pour la production virale et le titrage infectieux des particules virales	74
Tableau 16 : Liste du matériel utilisé pour le dosage d'activité hémagglutinante.....	74
Tableau 17 : Glycanes utilisés pour le développement d'un test d'analyse multiplexé. Les composés multivalent biotinylés sont décrit comme possédant un degré de pureté >95%, avec une précision de 10% sur la quantité massique des composés obtenue après lyophilisation (204).	75
Tableau 18 : Anticorps anti-tétraspansines utilisés pour le développement d'un test d'analyse multiplexé.....	75

Tableau 19 : Protéines recombinantes (tétraspanines) utilisées pour le développement d'un test d'analyse multiplexé	76
Tableau 20 : Protéines recombinantes utilisées pour le développement d'un test d'analyse multiplexée	76
Tableau 21 : Composantes du système mis en place pour le suivi en-ligne de productions virales.....	76
Tableau 22 : Souches virales utilisées durant le projet de thèse. *Souche réassortante entre A/H1N1/California/07/2009 et A/Puerto Rico/8/1934. Source : https://www.fludb.org	79
Tableau 23 : Détails du protocole de purification de matériel de type vésicules extracellulaires issues de cellules MDCK. F_{conc} : facteur de concentration volumique (ratio volume initial d'échantillon/volume de rétentat).	81
Tableau 24 : Détails des étapes de l'immunomarquage d'hémagglutinine de virus Influenza	95
Tableau 25 : Alimentations et communications entrées/sorties des composantes électroniques du système développé. Les schémas de branchement électroniques du contrôleur Biosep, du détecteur Air/liquide et de la pompe péristaltique sont issus des manuels d'utilisation respectifs (212–214)	99
Tableau 26 : Spécifications du module de filtration tangentielle utilisé.....	100
Tableau 27 : Paramètres analytiques évalués pour l'analyse de virus H1N1 (A/H1N1/reassortant/NYMCX-179) issu de culture cellulaire MDCK (échantillons de surnageant récoltés à 48 h.p.i.). Les données pour l'échantillon #1 correspondent aux courbes de calibration de la figure 5 . Les échantillons #1 et #2 ont été analysés sur un même capteur, l'échantillon #3 sur un deuxième capteur. $\sigma=0.001$ RU/s ($n=3$ pour l'échantillon #1).....	120
Tableau 28 : Constantes cinétiques apparentes déterminées lors de l'analyse d'échantillons de virus H1N1 (A/H1N1/reassortant/NYMCX-179) fragmentés et de vaccin commercial (Vaxigrip 2016-2017). Les sensorgrames ont été modélisés avec un modèle d'interaction 2:1 (liaison hétérogène) d'après le poids moléculaire de la HA (72 kDa).	121
Tableau 29 : Paramètres évalués, par dosage d'infectivité (PFU) et TRPS lors de l'analyse quantitative de virus H1N1, de la cinétique de production virale en culture cellulaire MDCK	123
Tableau 30 : Paramètres cinétiques évalués à partir des courbes concentration-réponse issues de l'analyse d'échantillons de vaccin commercial (Vaxigrip 2016-2017) pour différents ligands et/ou différentes densités surfaciques de ligand sur la base d'un modèle logistique. Le CE_{50} est identique au K_D dans le cas d'un modèle d'interaction 1 : 1.	132
Tableau 31 : Evaluation du degré d'homologie entre les tétraspanines chez les différentes lignées cellulaires utilisées pour la production virale d'influenza. Données : UniprotKB et BLAST. NR : non renseigné.....	135
Tableau 32 : Evaluation du procédé de purification développé pour la production de vésicules extracellulaires sur lignée MDCK.	138

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BCA : *BiCinchoninic acid Assay* (test basé sur l'acide bichinonique)

CCD, CMOS : Charged-coupled device, Complementary Metal Oxide Semiconductor

CEF : *Chicken Embryo Fibroblast*

CFCA : *Calibration-free concentration analysis*

DICT₅₀ : Dose infectieuse pour la culture tissulaire à 50%

DLS : Dynamic Light Scattering

ELISA : *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FDA : *Food and Drug Administration*

FFA : Fluorescent Focusing Assay

FOV : Champs de vue (*Field of view*)

HA : Hémagglutinine

HCP : Protéines dérivées de la cellule hôte (*Host Cell Proteins*)

HI : Inhibition d'hémagglutination (*Hemagglutination inhibition*)

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-MS : HPLC couplée à la spectrométrie de masse (*HPLC-Mass spectrometry*)

IU : Unités Internationales (*International Unit*)

IVP : Particules virales Infectieuses (Infectious viral particles)

LAL : Limulus Amoebocyte Lysate

LTD : Digestion limitée par la trypsine (*Limited trypsin digestion*)

MOI : Multiplicité d'infection (Multiplicity of infection)

MTL : Limitation par le transfert de masse (Mass transfer limitation)

MWCO : Seuil de Poids moléculaire (*Molecular Weight Cut-Off*)

NA : Neuraminidase

NSTEM : *Negative Stained Electron Microscopy*

NTA : *Nanoparticle Tracking Analysis*

OMS/WHO : Organisation mondiale de la santé/*World Health Organisation*

Liste des abréviations

PAT : *Process Analytical Technology*

EP : Pharmacopée européenne (*European Pharmacopeia*)

PFU/FFU : *Plaque forming unit/Fluorescence Focusing Unit*

PPVs : Particules pseudo-virales (*VLPs : Virus-like Particles*)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAM : Monocouche auto-assemblée (*Self Assembled Monolayer*)

SCK : Analyse cinétique en cycle unique (*Single Cycle Kinetics*)

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis*)

SPR(i) : (Imagerie par) résonance plasmonique de surface

SRID : Immunodiffusion radiale (*Single radial Immunodiffusion*)

TFF : Filtration tangentielle (*Tangential Flow filtration*)

TIRF : Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (*Total internal reflection fluorescence microscopy*)

TIV/QIV : Vaccin inactivé trivalent/quadrivalent (*Trivalent/quadrivalent inactivated vaccine*)

TRPS : *Tunable Resistive Pulse Sensing*

VEs : Vésicules extracellulaires

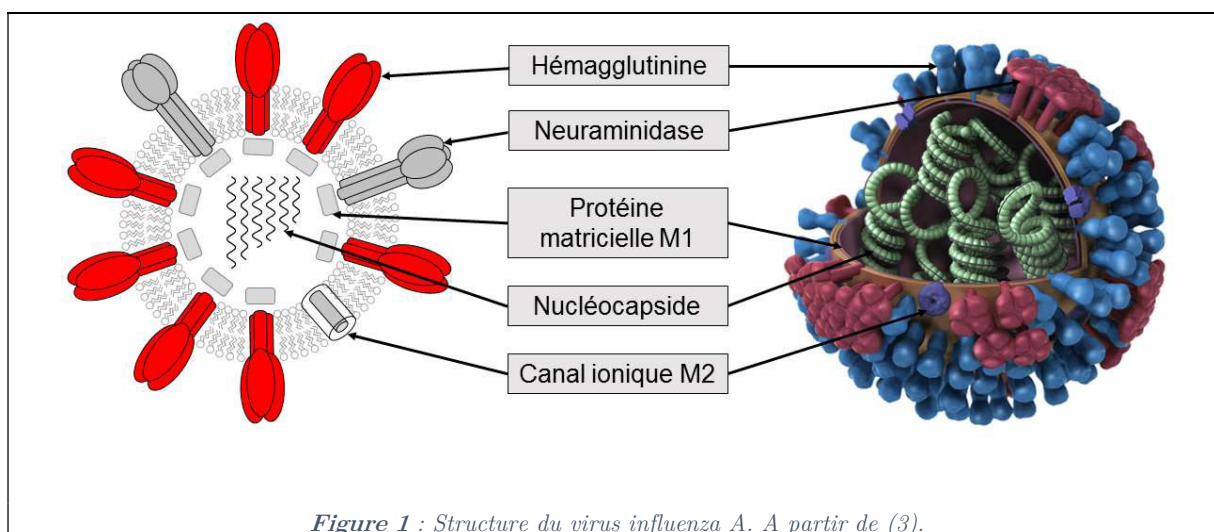
I.

LE VIRUS INFLUENZA ET LES BIOPROCEDES DE PRODUCTION DE VACCIN INFLUENZA

I.1. Le virus Influenza

Le virus influenza est l'agent pathogène à l'origine de la grippe, maladie respiratoire 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). C'est un virus à ARN enveloppé appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. La **Figure 1** présente la structure du virus influenza A. *Influenzae* est classé selon 4 types (A, B, C ou D). 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.

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 la M2 minoritaire (2).



I.1.1. 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 membrane de la cellule hôte. Cette liaison est réalisée entre l'hémagglutinine virale et les résidus terminaux de type acide sialique présents à l'extrémité des glycoprotéines membranaires de la cellule hôte. Cette étape va précéder l'internalisation du virus. HA se présente sous la forme d'une protéine trimérique, résultant de l'association non covalente de monomères (d'environ 70-75 kDa) (4). 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.

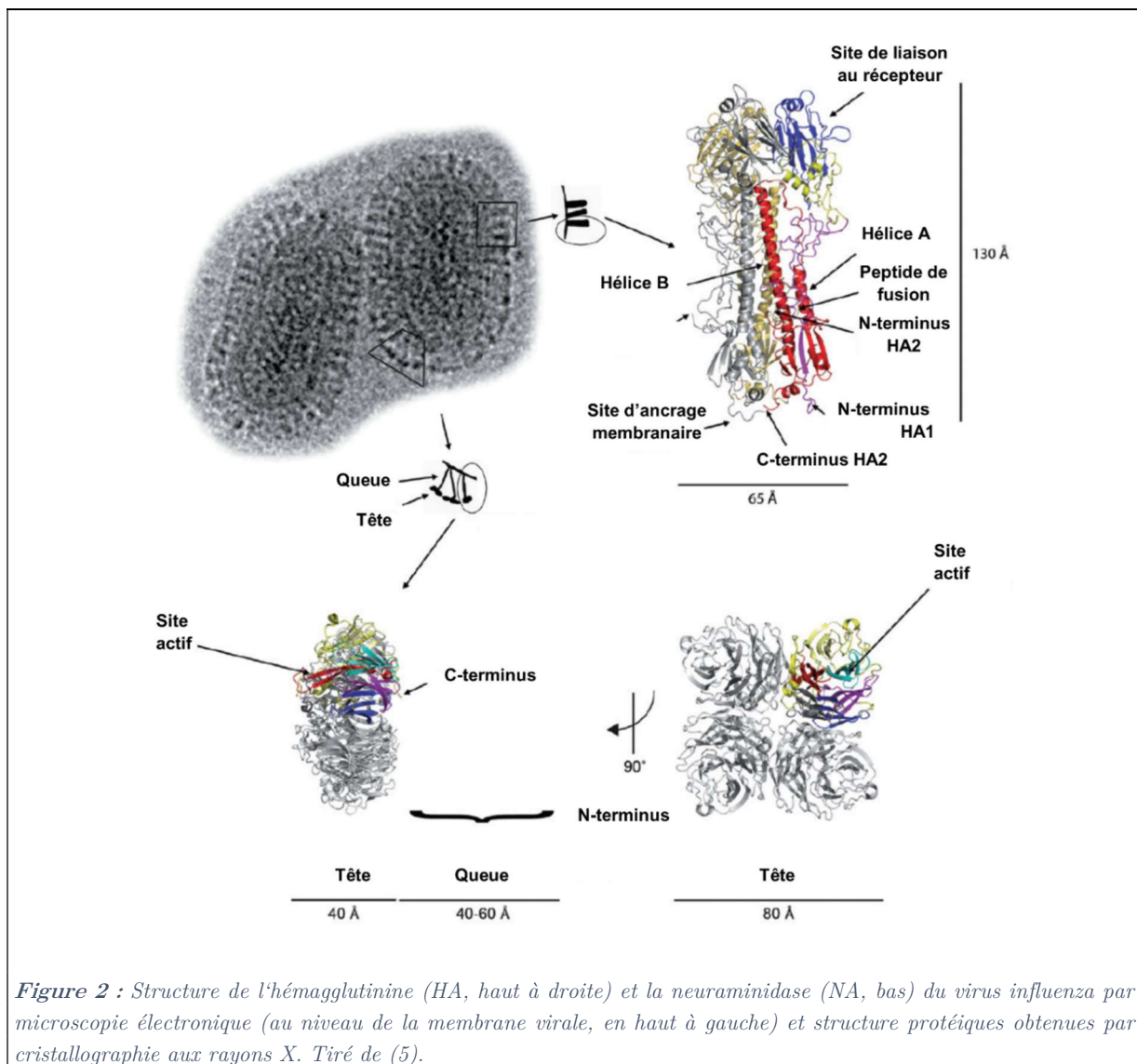


Figure 2 : Structure de l'hémagglutinine (HA, haut à droite) et la neuraminidase (NA, bas) du virus influenza par microscopie électronique (au niveau de la membrane virale, en haut à gauche) et structure protéiques obtenues par cristallographie aux rayons X. Tiré de (5).

Le monomère HA0 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), et la queue formée par l'autre partie de HA1 et HA2 (domaine fortement conservé). La neuraminidase (NA) est une glycoprotéine homotétramérique, formée par l'association non covalente de 4 monomères, d'une taille d'environ 240 kDa (5). 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, un équilibre optimal des proportions et des activités des protéines membranaires HA et NA est indispensable afin d'obtenir une réplication et une transmission efficaces (6).

I.2. La vaccination antigrippale

I.2.1. 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) (7). Une épidémie est à la propagation rapide d'une maladie infectieuse dans une région donnée. Une pandémie est la propagation mondiale d'une nouvelle maladie. Cette épidémiologie est liée aux mécanismes d'évolution du virus influenza guidés par l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. 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 (8). Ce phénomène permet l'échappement du virus à l'immunité acquise et justifie la nécessité d'une vaccination antigrippale annuelle. L'ARN polymérase virale induit un grand nombre d'erreurs de réplication, et ne comporte pas de mécanisme de correction (9). La fréquence des mutations ponctuelles du génome viral est donc élevée. La pression de sélection 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 (9,10). La nature segmentée du génome viral permet également de générer des souches réassortantes lors d'une infection (par co-infection de deux souches et réassortiments génétique). Le virus possède ainsi une nouvelle composition de segments (11). Ce phénomène est nommé **saut** ou **cassure antigénique**.

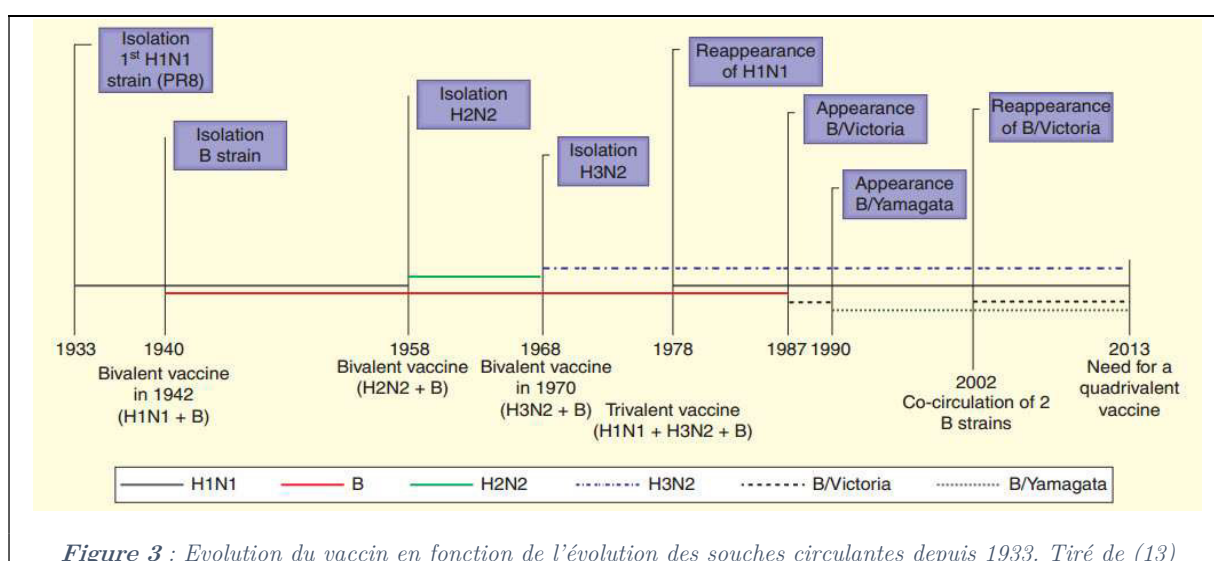
I.2.2. Principe de la vaccination

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*. Cette réponse immunitaire va notamment avoir une composante humorale (anticorps neutralisants) et cellulaire (lymphocytes T). En parallèle, il faut savoir qu'il existe différentes classes de molécules antivirales qui ont été développées pour le traitement curatif de l'infection à *Influenza* : les amantadanes, les inhibiteurs de neuraminidase, les inhibiteurs de fusion membranaire et les inhibiteurs de l'ARN polymérase ARN-dépendants.

I.3. Les vaccins anti-influenza

I.3.1. Evolution de la composition vaccinale

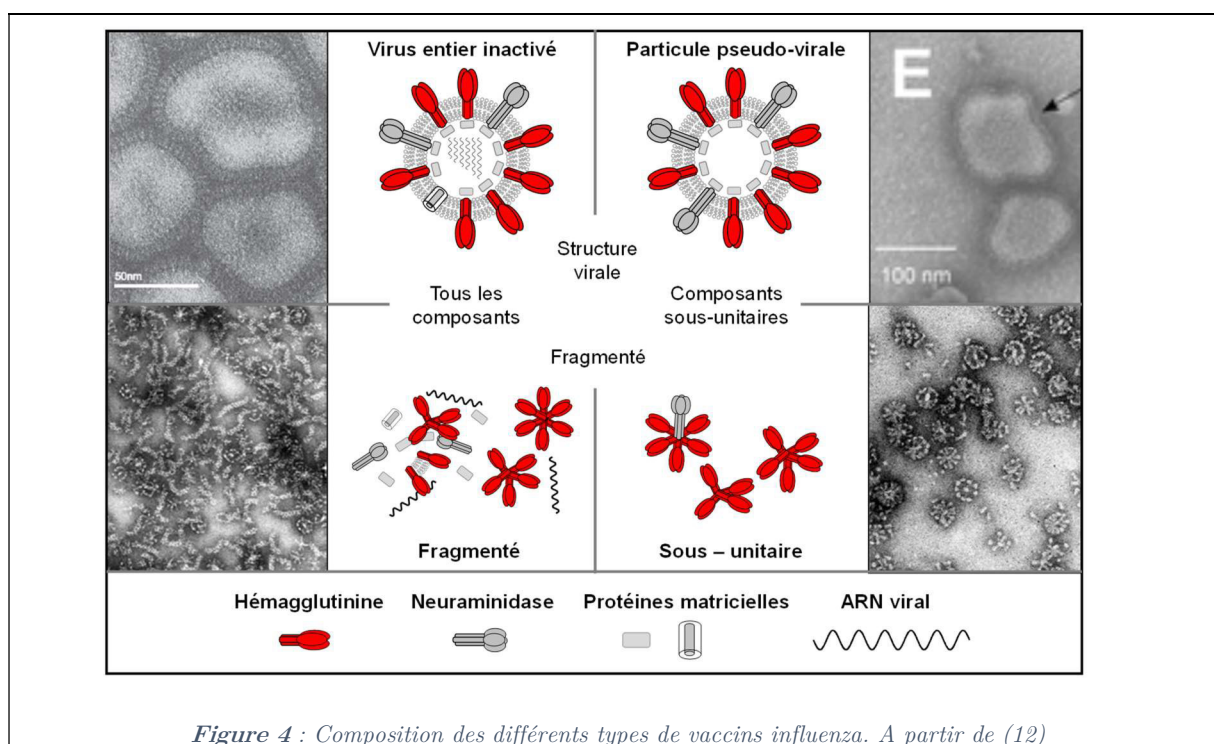
Du fait de la dérive antigénique du virus influenza, les souches du virus influenza échappent à l'immunité spécifique acquise préalablement par infection naturelle ou vaccination (notamment par un manque d'immunité croisée des anticorps neutralisants développés lors d'une immunisation) (12). Depuis 1973, l'OMS émet des recommandations annuelles concernant la composition des futurs vaccins sur la base des données épidémiologiques et de la caractérisation des souches circulantes (13,14). L'OMS recommande depuis la saison 2018-2019 la formulation de vaccins quadrivalents (*QIV*), avec ajout d'une souche B supplémentaire à la formulation pour faire face à la co-circulation et la dérive antigénique des souches B circulantes et combler le manque d'efficacité du vaccin trivalent (12,13).



I.3.2. Les différents types de vaccins influenza

- Les vaccins atténués :

Le premier vaccin Influenza a été un vaccin vivant atténué, développé en 1936 par Smorodintseff (13). Les vaccins atténués sont habituellement formulés à partir de souches virales sensibles à la température et adaptées au froid. Ainsi ces souches vont avoir la capacité de se répliquer uniquement au niveau du tractus respiratoire supérieur (9). Cependant, malgré la maîtrise du procédé d'obtention de souches moins virulentes après plusieurs passages en œuf, cette virulence peut être retrouvée par certaines souches virales (phénomène dit *de réversion*). La nature des vaccins vivants atténués les rend plus complexes à utiliser pour de nombreuses raisons en dehors du problème de leur instabilité : 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 (13).



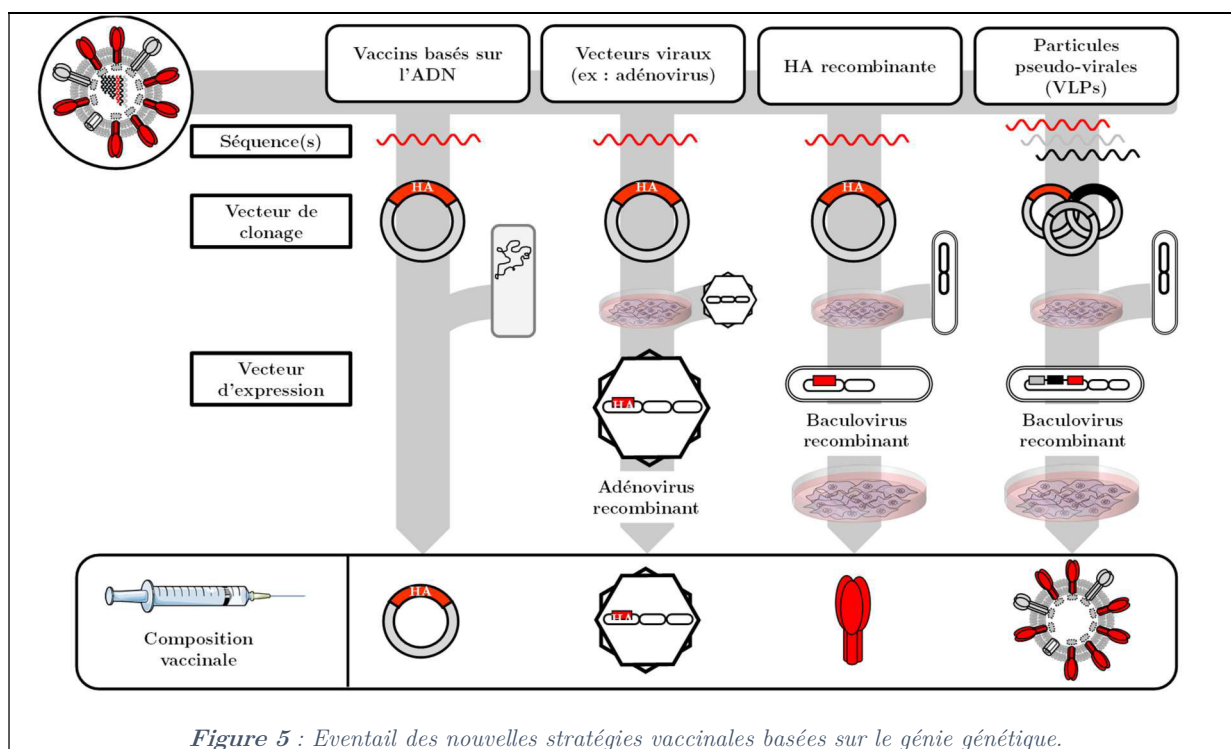
- Les vaccins inactivés :

Comme l'indique la **Figure 4**, il existe différents types de vaccins influenza inactivés, distinguables entre eux selon l'organisation structurelle des antigènes vaccinaux et le nombre de constituants contenus dans le vaccin vis-à-vis du virus influenza natif (12). Les vaccins quadrivalents actuellement commercialisés sont en majorité des vaccins inactivés. Ils sont réalisés

à partir de virus produits par culture sur œuf embryonné et inactivés par fragmentation grâce à l'adjonction de détergents (12). Le procédé de production de vaccins inactivés par ovoculture est détaillé dans la **partie I.4**.

- **Les vaccins recombinants**

De nouvelles stratégies vaccinales basées sur les outils du génie génétique ont vu le jour ces 20 dernières années (15). La **Figure 5** schématise les différentes stratégies alternatives à la production de vaccins inactivés actuellement étudiées. Leur intérêt réside dans la capacité à générer un candidat vaccin recombinant directement à partir de la/des séquence(s) codante(s) pour le/les antigènes d'intérêt de la souche vaccinale. Ces approches sont donc potentiellement plus rapides que le procédé « œuf » traditionnel pour générer des lots vaccinaux dans le cas de pandémies occasionnées par une souche émergente. Les approches basées sur l'expression de protéine recombinante ou de particules pseudo-virales utilisent l'expression en culture cellulaire (voir partie I.4.1).



Le premier vaccin recombinant ciblant le virus *Influenza* fut approuvé par la FDA en 2013, et commercialisé sous le nom de FluBlok® (Protein Science). Ce vaccin sous-unitaire consiste en une HA recombinante purifiée produite sur cellule d'insecte (lignée expresSF+) (16,17). La durée totale du procédé a été évaluée comme étant inférieure à 6 semaines. Concernant les autres

stratégies développées, différents candidats vaccins issus de procédés de production de particules pseudo-virales (ou *VLP*) d'Influenza sont en étude clinique de phase III. Une revue bibliographique des bioprocédés de production et de purification de particules pseudo-virales d'influenza a été publiée dans le cadre de cette thèse (voir **Annexes 4**).

I.4. Les procédés de production d'antigènes vaccinaux d'influenza

I.4.1. Le procédé basé sur l'ovoculture

Ce procédé a été mis en place dès les années 1940 et reste encore aujourd'hui le procédé qui supporte plus de 90% de la production vaccinale annuelle, évaluée à 620 millions de doses pour la saison 2011 (18). La **Figure 6** indique les différentes étapes du procédé de production de lots de vaccins monovalents par ovoculture.

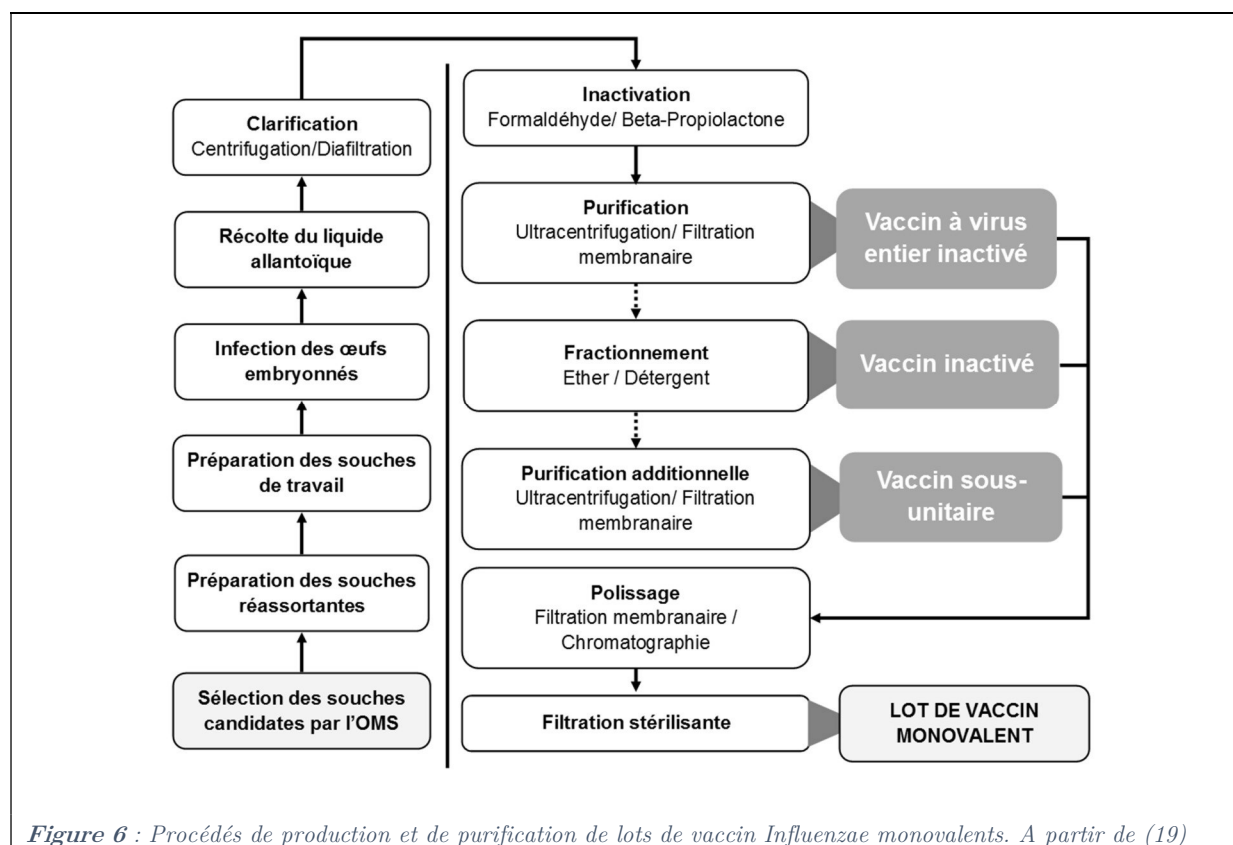


Figure 6 : Procédés de production et de purification de lots de vaccin *Influenzae* monovalents. A partir de (19)

À la suite de la sélection des souches de référence par l'OMS, la première phase de production consiste en la préparation de souches réassortantes hautement répliquatives (par réassortiment en œuf et sélection positive de la souche candidate avec une souche A/PR8 de productivité en œuf élevée ou par la technique de génétique inverse « *reverse genetics* » en culture cellulaire, uniquement dans le cas des souches A). Cette étape permet de limiter les différences de taux de

production d'antigènes et la variabilité d'infectivité des différentes souches pour l'œuf. Ces souches vont permettre de préparer des lots de semences vaccinales qui seront inoculés dans la cavité allantoïque d'œufs à 10-11 jours d'embryogenèse. A la suite de l'infection et de la production virale (3-4 jours), le liquide allantoïque est récolté et clarifié par centrifugation ou filtration membranaire. Après une inactivation chimique optionnelle, différentes étapes de fractionnement et purification vont permettre d'obtenir les différents types de vaccins détaillés précédemment (voir partie I.3.1).

Tableau 1 : Critères d'évaluation des lots de vaccins monovalents produits par ovoculture. Les références des méthodes à appliquer selon la Pharmacopée Européenne (EP) 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 Kon et al. (20).

Paramètres	Cible	Spécifications	Méthode
Antigènes	HA NA	15 µg HA/souche/dose	SRID* [EP 2.7.1], Test HA, Dot-Blot
	HA NA	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	< 40 µg protéine autre que HA/souche/dose	Dosages colorimétriques (Bradford, BCA)
Ovalbumine	Ovalbumine	< 2 µg/100 µg HA	Dosage ELISA [EP 2.7.1]
Quantité d'acides nucléiques	ADN viral et cellulaire	<10 ng/dose - Fragments <200 paires de base	Dosage spectrophotométrique, Electrophorèse
Quantité d'endotoxines	Endotoxines	< 25-100 IU/dose	Test « Limulus Amoebocyte Lysate » (LAL) [EP 2.6.14]
Composés chimiques résiduels	B-propiolactone, Formaldehyde Triton-X100	<10 ppm < 0,2 g/L < 100 µg/100 µg HA	RMN, Dosage colorimétrique [EP 2.4.18], Chromatographie
pH	pH	6,9-7,7	Potentiométrie [EP 2.2.3]
Stérilité	Contaminants viraux/bactériens	Absence d'agents infectieux	Test de stérilité [EP 2.6.1]

Les étapes de purification finale des lots de vaccins monovalents permettent notamment de répondre aux critères d'évaluation définis par les agences réglementaires pour la délivrance des lots, détaillés dans le **Tableau 1**. Le premier critère d'évaluation est l'activité vaccinale, sur la base de laquelle les producteurs vont réaliser la formulation des lots de vaccins quadrivalents.

Les principes et tests analytiques associés à l'évaluation de l'activité des productions vaccinales seront détaillés dans le **Chapitre II** de cette thèse.

Bien que les procédés basés sur l'ovoculture soient éprouvés, ils présentent certaines contraintes qui limitent la capacité des producteurs à produire rapidement des lots de vaccins lors de l'émergence de nouvelles souches, notamment pandémiques. Les contraintes majeures sont :

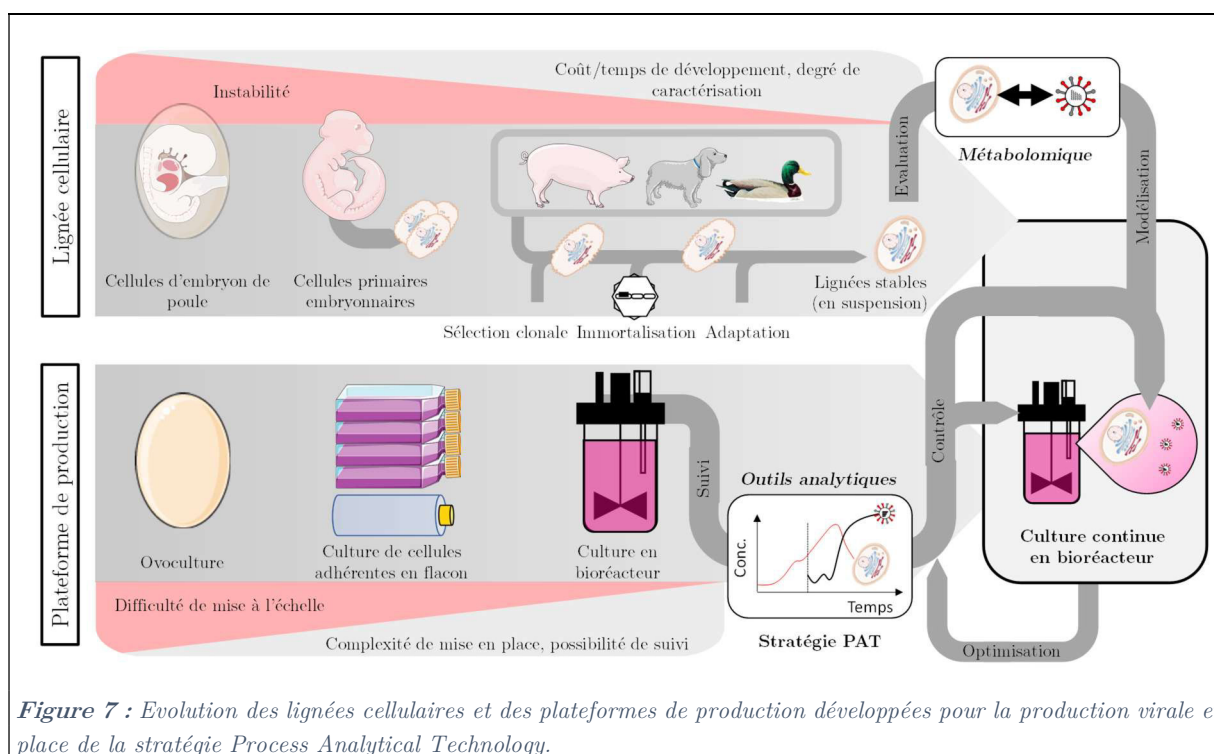
- *La durée du procédé (4-5 mois)*
- *Le fait d'être tributaire de l'approvisionnement en œufs embryonnés, ce qui constitue un risque majeur dans le cadre d'épizooties telles que la grippe aviaire*
- *La nécessité de générer des souches réassortantes hautement répliquatives adaptées à l'ovoculture (15).*

I.4.2. Les procédés alternatifs basés sur la culture cellulaire

La culture cellulaire présente différents avantages vis-à-vis de l'ovoculture pour la mise au point de procédés de production vaccinaux alternatifs. Elle permet notamment de rendre le procédé non tributaire de l'approvisionnement en œufs embryonnés. La durée des procédés basés sur la culture cellulaire est inférieure à celle du procédé d'ovoculture traditionnel (12). Elle permet de réaliser des productions dans un environnement clos stérile. Enfin, il est possible de réaliser un contrôle du procédé sur la base du suivi de différents paramètres de culture (ex : densité cellulaire, viabilité, oxygène dissous, pH,...) afin de standardiser les procédés vaccinaux.

Les productions virales peuvent être réalisées en cellules dites « primaires » (cellules directement dérivées d'un tissu) ou en cellules de lignée cellulaire (voir **Figure 7**). Les cultures de cellules primaires peuvent être réalisées « directement » par ovoculture ou après traitement enzymatique des embryons afin d'obtenir une suspension de cellules primaires adhérentes (fibroblaste d'embryon de poulet ou *Chicken Embryo Fibroblast* : CEF) (21). Les cellules de lignée sont soit des cellules de lignées « conventionnelles » (ex : MDCK ou Vero), soit des cellules néoplasiques dérivées de cellules humaines ou animales transformées avec des oncogènes viraux/cellulaires ou des gènes immortalisant (22). Ces dernières peuvent également être adaptées à la culture en suspension, à la culture en milieu sans sérum voir dans un milieu de composition chimiquement définie. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes pour les producteurs. Les cellules en suspension permettent une mise à l'échelle du procédé facilitée grâce à l'utilisation de

bioréacteurs de grand volume (13,23). L'utilisation de milieu de composition chimiquement définie permettra notamment de faciliter la purification et la validation des lots vaccinaux.



Les cellules adhérentes sont, elles, incubées en flacon de culture cellulaire ou en flacon roulant afin de former des mono- ou multicouches infectées. Elles peuvent également être cultivées sur microporteurs en bioréacteur.

Plusieurs lignées cellulaires ont été testées et validées depuis le milieu des années 1990 pour la production de virus influenza (**Tableau 2**). Différents critères sont évalués lors du développement : la permissivité virale (inoculum viral, ajout de trypsine), la productivité (obtention rapide de titres élevés), la stabilité des particules virales et la présence de contaminants issus de la culture (22). Pour certaines de ces lignées récemment développées, une évaluation métabolomique a également été réalisée (24,25) et l'immunogénicité des productions vaccinales réalisées évaluée (26). La conception à *façon* peut également aller jusqu'à l'optimisation du profil de glycosylation des protéines exprimées (26).

Tableau 2 : Lignées cellulaires utilisées pour la production de virus Influenza en culture cellulaire (21,22).

Type		Nom	Origine	Référence
Conventionnelle	Adhérente	Madin–Darby canine kidney (MDCK)	Canine (épithélium rénal)	(22)
		Vero	Simienne (épithélium rénal)	(22)
		A 549	Humaine (carcinome pulmonaire)	(22)
	En suspension	MDCK 33016-PF	Canine (épithélium rénal)	(22)
		HEK-293SF-3F6	Humaine (cellule embryonnaire rénale)	(27)
À façon (Designer cell line)	En suspension	PER.C6	Humaine (rétinoblaste embryonnaire)	(21)
		AGE1.CR, AGE1.CR.pIX	Aviaire (cellule primaire rétinienne de canard)	(28,29)
		CAP	Humaine (aminocyte)	(30)
		PBS-12SF	Aviaire (cellule primaire embryonnaire de poulet)	(31)
		DuckCelt-T17	Aviaire (cellule primaire embryonnaire de canard)	(32)
		PBG.PK2.1	Porcine (épithélium rénal de porc)	(25)

Le développement des procédés et les évaluations cliniques réalisées ont conduit à la mise sur le marché, depuis 2007, de plusieurs vaccins influenza produits par culture cellulaire (voir **Tableau 3**). À l'éventail de vaccins alternatifs basés sur l'infection de cellules en culture s'ajoute également les vaccins recombinants en développement (voir partie I.3.1). Cependant, **face à l'émergence de ces nouvelles formulations et plateformes d'expression, il apparaît que l'évaluation de l'activité des lots vaccinaux et leur standardisation est contrainte par le test de référence utilisé à l'heure actuelle, la SRID (33)**. Face à ce constat, les autorités régulatrices incitent les industriels à développer de **nouveaux outils analytiques pour accélérer l'évaluation et la libération des lots vaccinaux, particulièrement dans le cas de vaccins pandémiques pour lesquels les stratégies alternatives à l'ovoculture apparaissent plus adaptées (34–36)**. Les tests analytiques actuels et ceux en développement pour l'évaluation des productions de vaccins influenza sont décrits dans le **Chapitre II** de cette thèse.

Par ailleurs, la complexité et les contraintes de développement de procédés basés sur la culture cellulaire font que ces derniers ne sont pas encore compétitifs face à l'ovoculture. La stratégie *Process Analytical Technology* (PAT) consiste en l'évaluation, le contrôle et l'optimisation des bioprocédés sur la base du suivi analytique de paramètres critiques. L'application de la stratégie PAT dans les bioprocédés de production virale pourrait accélérer le développement, l'évaluation et la validation des nouveaux procédés basés sur la culture cellulaire (voir **Figure 7**). Ce point est également détaillé dans le **Chapitre II** de cette thèse.

Tableau 3 : Liste des vaccins antigrippaux commercialisés produits par culture cellulaire.

Produit	Nom commercial	Producteur	Type	Plateforme cellulaire
Vaccin saisonnier	Optaflu/Flucelvax	Seqirus (ex Novartis)	Vaccin inactivé	MDCK
	Preflucel	Baxter		Vero
	FluBlok	Sanofi (ex Protein Sciences)	Vaccin recombinant	Cellule d'insecte
Vaccin pandémique	Celvapan	Baxter	Vaccin inactivé	Vero

II.

L'EVALUATION DES

PRODUCTIONS

VACCINALES D'INFLUENZA :

PRINCIPES ET TESTS

ANALYTIQUES ASSOCIES

II.1. En aval du procédé - les critères réglementaires pour la libération des lots de vaccin

De nombreuses exigences réglementaires guident le contrôle qualité des lots de vaccin et ont été détaillées dans le premier chapitre de cette thèse (**Tableau 1**). Ce chapitre se focalisera sur l'attribut de qualité critique majeur du vaccin, à savoir l'**activité vaccinale** et les tests analytiques permettant son évaluation.

II.1.1. L'activité vaccinale

Selon la *Food and Drugs Administration* (FDA), l'activité vaccinale (*vaccine potency*) se traduit par (37):

“la capacité spécifique d'un produit, indiquée par des tests appropriés ou par des données cliniques contrôlées adéquatement, obtenues après administration du produit, *d'obtenir un résultat donné.*”

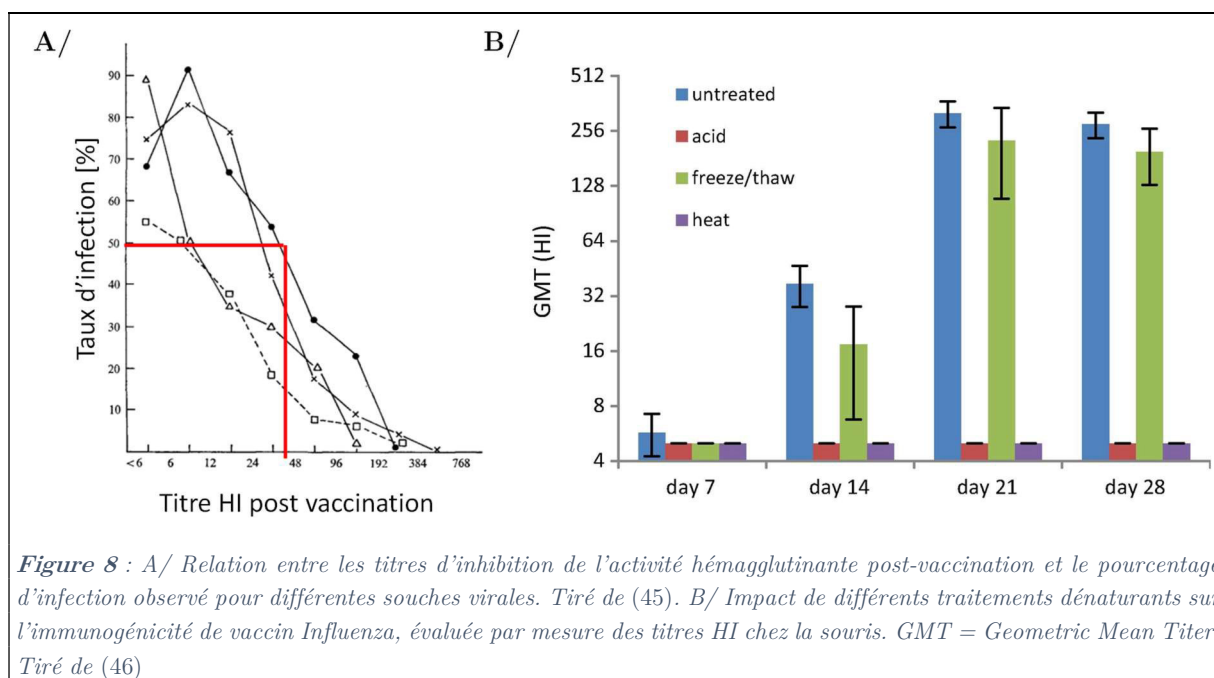
Selon la procédure d'harmonisation internationale (*International Council for Harmonisation - ICH*) Q6B (38):

“la mesure de l'activité biologique par l'utilisation d'un dosage biologique quantitatif adapté (aussi appelé dosage d'activité) basé sur les attributs du produit liés aux propriétés biologiques d'intérêt.”

Contrairement aux molécules pharmaceutiques, l'activité des produits biopharmaceutiques n'est pas directement corrélée à la masse d'un ingrédient actif. En effet, ces produits particulièrement complexes entraînent un grand nombre d'interactions biologiques après administration. Pour les vaccins, le résultat désiré est une protection contre la maladie, nommée *efficacité vaccinale* (voir paragraphe suivant). Ainsi, l'éventail des mécanismes de la réponse immunitaire post-vaccination est large (réponse humorale et cellulaire), et la propriété évaluée par le dosage d'activité doit, par définition, se rapprocher au plus près du mécanisme d'action majeur du vaccin afin que le dosage soit pertinent (39,40). Ici, l'activité du vaccin influenza est dépendante de la bonne conformation protéique des antigènes vaccinaux, qui peuvent subir une dénaturation (voir **Figure 8B**). Il apparaît donc indispensable de pouvoir évaluer l'activité vaccinale tout au long des procédés de production vaccinaux afin de pouvoir contrôler et optimiser ces derniers. Ce point sera abordé dans la **partie II.2**.

II.1.2. De l'efficacité à l'activité vaccinale

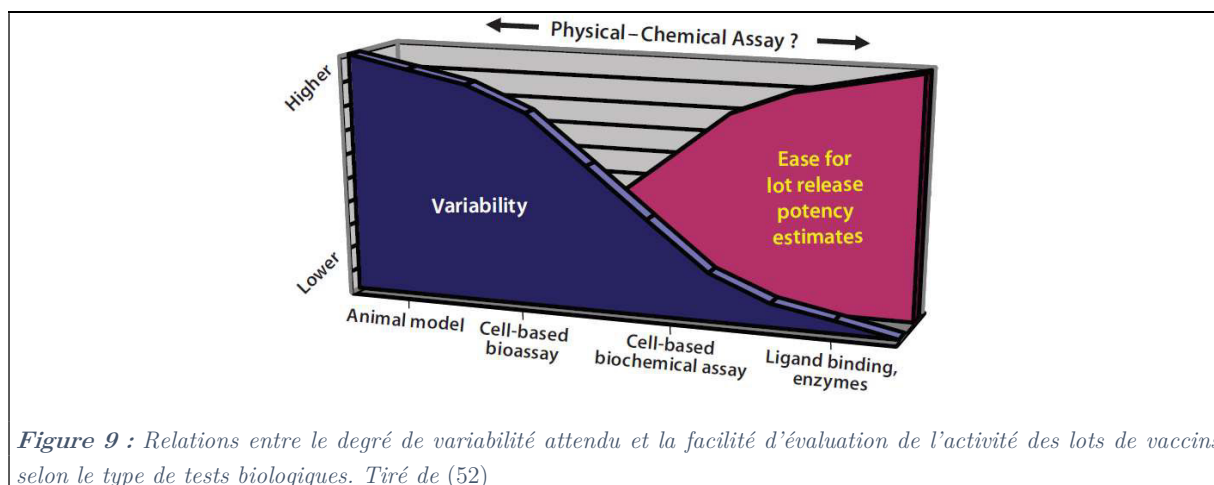
Il est à noter que les dosages d'activité, réalisés sur le produit au cours du procédé, ne permettent pas d'évaluer directement l'efficacité vaccinale. Dans le cas du vaccin influenza, la HA virale est l'antigène vaccinal majeur. L'efficacité vaccinale est donc actuellement basée uniquement sur la réponse humorale, à savoir sur l'évaluation de la séroprotection d'un individu par la mesure du titre en anticorps neutralisants anti-HA induits par la vaccination (41,42). Ce titre est évalué par un dosage d'inhibition de l'activité d'hémagglutination (voir **Figure 10**). Il a été démontré qu'un titre d'inhibition d'hémagglutination (titre *HI*) post-vaccination supérieur à 40 dans la population étudiée permettait d'obtenir 50% de protection dans la population vaccinée (voir **Figure 8A**) (42–44). Cette relation constitue le *corrélât de protection* reconnu actuellement pour le vaccin Influenza.



Le corrélât de protection actuel, basé sur une évaluation unique des titres HI, tend cependant à être remis en cause (42,47,48). En effet, le spectre de la réponse immunitaire post-vaccination s'étend aussi à d'autres voies (anticorps ciblant la queue de la HA, anticorps anti-NA, immunité cellulaire). De nombreuses stratégies vaccinales en développement ciblent l'induction d'une réponse immunitaire plus large et durable que celle induite par le vaccin traditionnel (49), et nécessitent de nouveaux corrélats de protection appropriés (42,47).

II.1.3. Dosage d'activité : Le cas du vaccin anti-Influenza

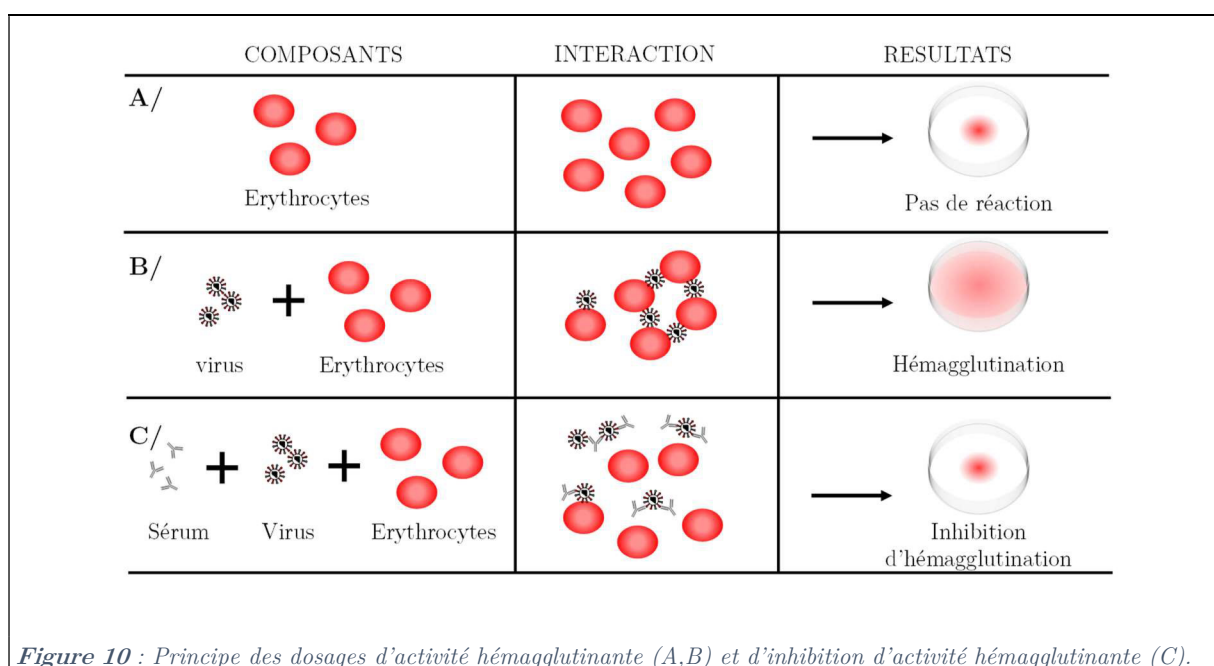
En pratique, l'efficacité vaccinale est difficilement mesurable avec rapidité et précision (50). De nombreux facteurs entrent en jeu, à savoir la variation antigénique annuelle, l'âge des sujets vaccinés ou bien la mémoire immunitaire. Il existe de nombreux modèles animaux (souris, furet) qui pourraient être utilisés pour les études d'immunogénicité *in vivo*, mais ces études sont difficiles à mettre en place et sujettes à une forte variabilité (voir **Figure 9**, (51)). Par mesure de simplicité, les autorités régulatrices ont donc basé l'évaluation des lots vaccinaux sur un dosage d'activité. Historiquement, l'activité du vaccin anti-influenza était évaluée sur la base d'un dosage par hémagglutination, ce qui présentait un grand nombre de biais. Le dosage par immunodiffusion radiale (ou *SRID*, voir II.1.3.2) est devenu le dosage de référence depuis 1978 (51). L'exigence réglementaire pour la formulation des lots de vaccin est une concentration de 15 µg de HA par souche vaccinale et par dose pour induire une séroconversion significative chez l'individu vacciné (c.à.d. un titre HI > 40).



II.1.3.1. Le dosage d'activité hémagglutinante

Ce test a été le premier développé pour la quantification de virus influenza (53). Il est basé sur la propriété d'hémagglutination du virus influenza. Celle-ci correspond à des interactions entre les particules virales et les hématies à la suite d'une liaison de la protéine HA aux acides sialiques exposés à la membrane des hématies. Lorsque le ratio entre les particules virales et les hématies est suffisamment élevé, les hématies se lient les unes aux autres par l'intermédiaire des particules virales pour former un réseau diffus et ne sédimentent pas au fond du puit (voir **Figure 10**). De

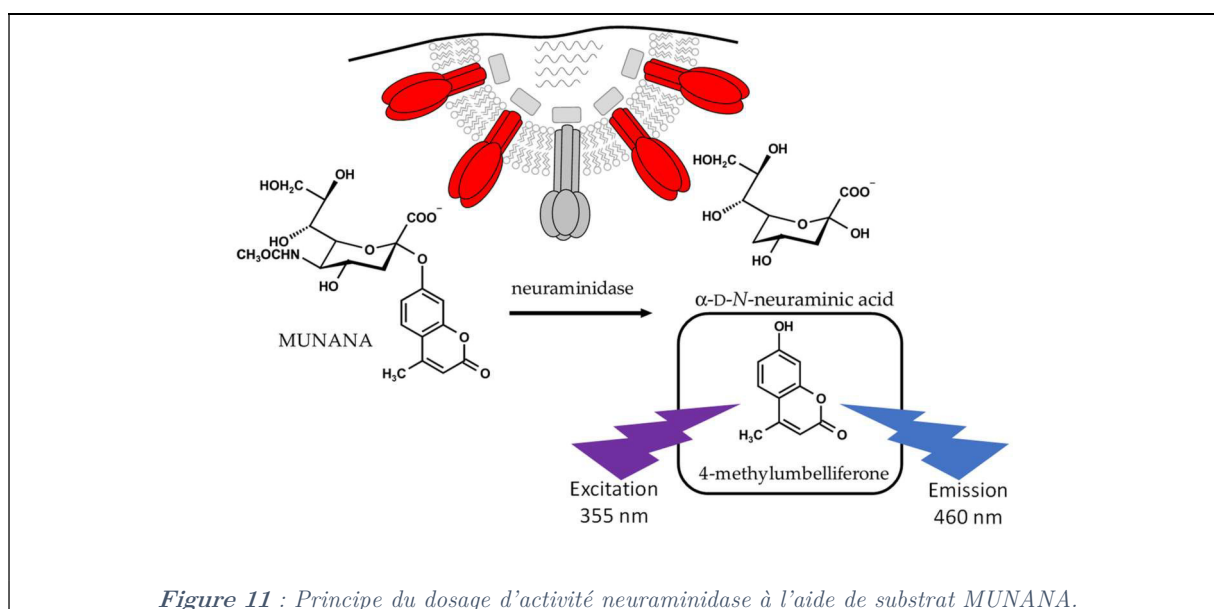
ce fait, le test estime la quantité de particules virales, et non directement de HA. Il a été évalué par microscopie électronique quantitative que le point limite d'agglutination correspondait à un ratio d'environ une particule virale par hématie (54). Une équivalence d'environ 1 unité HA pour 10^6 particules virales a été démontrée (55). Cependant cette estimation est approximative et le dosage HA présente un grand nombre de variables non contrôlées, dont la variation de l'activité hémagglutinante en fonction des souches virales, du substrat cellulaire utilisé pour la production virale et de l'origine des hématies utilisées. Ainsi, l'utilisation d'hématies issus de différentes espèces à concentrations variables (0,5-1,25%) a été rapportée. Il n'existe cependant pas à ce jour de protocole « universel » standardisé bien que l'OMS ait publié des procédures (56). Concernant la précision du dosage : elle a été évaluée à $\pm 30-40\%$ sur le titre obtenu avec un résultat opérateur dépendant (57). Il faut également que les échantillons soient purifiés et relativement concentrés avant analyse (34).



II.1.3.2. Le dosage d'activité neuraminidase

Il n'existe pas de dosage standardisé pour quantifier la neuraminidase (NA) présente dans les vaccins influenza. Cependant, l'activité spécifique de la neuraminidase peut être évaluée par méthode enzymatique. Le dosage de l'activité NA exploite la méthode de Potier et al. (58), basée sur le clivage enzymatique d'un substrat par la neuraminidase virale. Le substrat est l'acide N-

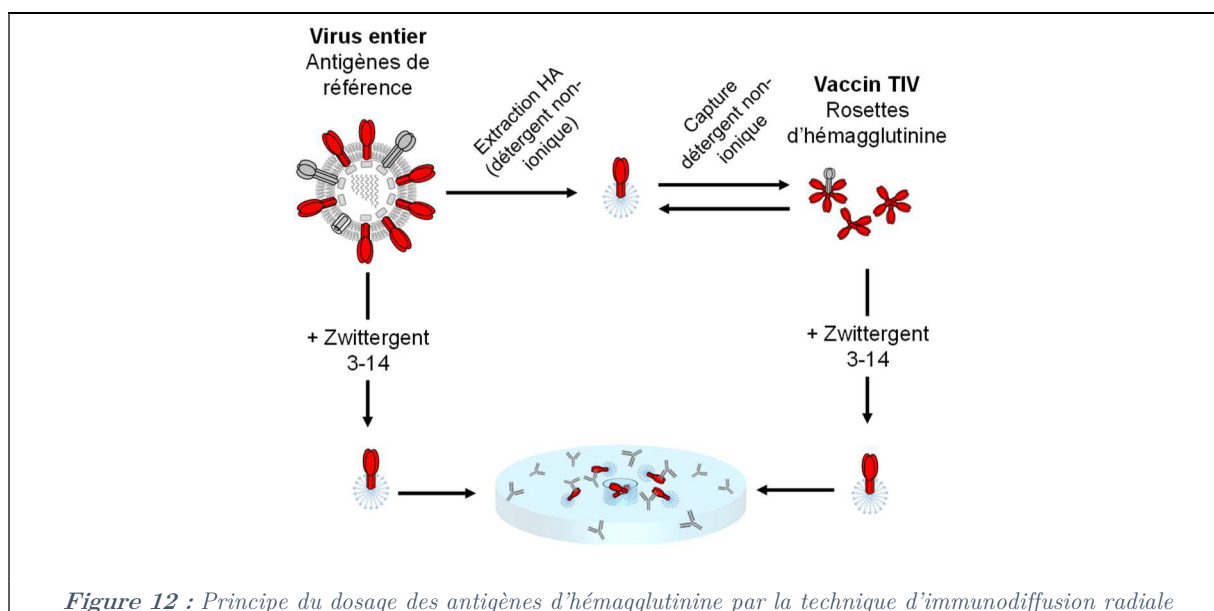
acétylneuraminique, substrat « naturel » de la NA, couplé à différents chromophores. Le test le plus utilisé est basé sur l'acide 20-(4-méthylumbelliferyl)- α -D-N-acétylneuraminique (MUNANA) qui permet, après clivage, d'obtenir la 4-Méthylumbelliférone (4-MU), mesurable par fluorescence (voir **Figure 11**). Plusieurs kits commerciaux (basés sur des méthodes de chemiluminescence, fluorimétriques ou colorimétriques) sont aujourd'hui disponibles. Ce test est généralement utilisé pour une évaluation qualitative de l'activité NA de souches virales. La NA d'influenza étant une enzyme Michaelienne, il est également possible d'évaluer un taux de réaction r_{max} proportionnel à la concentration d'enzyme active, ce qui permet une évaluation quantitative de la NA active dans des échantillons contenant du virus (57).



II.1.3.3. Le dosage d'activité par SRID : principe et limitations

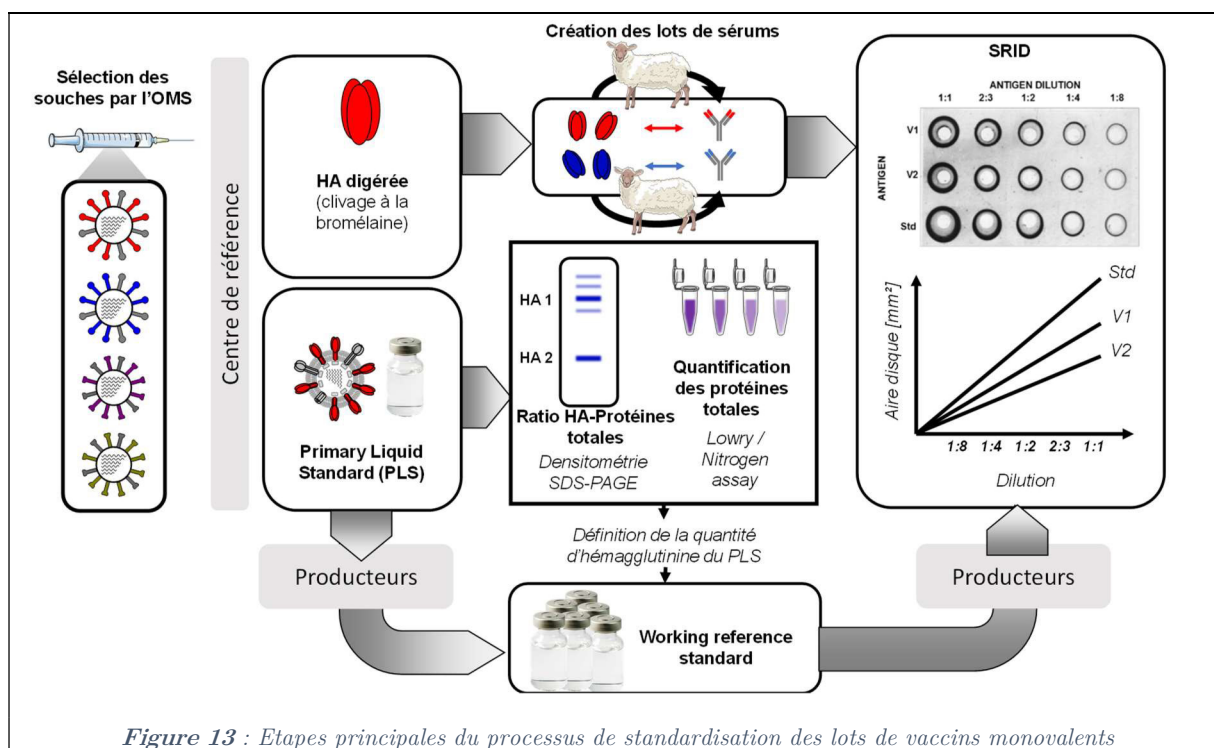
Le dosage par immunodiffusion radiale (ou *Single Radial Immunodiffusion* : SRID) est encore à l'heure actuelle l'unique dosage de référence validé par les instances réglementaires pour la quantification des lots de vaccins influenza (51). Il est basé sur l'immunoprécipitation des antigènes de HA lors de leur diffusion dans un gel d'agarose en présence d'un sérum préalablement incorporé (59). L'utilisation d'un sérum permet de cibler différents épitopes de la HA, ce qui permet la formation de complexes HA-anticorps polyclonaux et entraîne une immunoprécipitation (60). La variable mesurée est le diamètre du disque d'immunoprécipitation obtenu après diffusion des trimères de HA dans le gel et formation des complexes HA-anticorps

(34). Le gel est par la suite coloré par du bleu de Coomassie pour révéler les disques d'immunoprécipitation. Ce test a été optimisé de manière à obtenir des résultats fiables lors de la caractérisation des différents types de préparations vaccinales disponibles sur le marché lors de son développement en 1977, à savoir les vaccins inactivés et les vaccins trivalents atténués produits par ovoculture (51). Du fait du pré-traitement de l'échantillon par du détergent zwitterionique, le dosage SRID mesure principalement la HA sous sa forme trimérique (61) (voir **Figure 12**). Une courbe de calibration intra-analyse est réalisée à partir de réactifs de références de concentration en HA connues et spécifiques à chaque souche vaccinale. Ceci permet d'obtenir une activité relative des lots testés en évaluant le ratio des courbes dose-réponse.



Ainsi, cette méthode nécessite la production de deux réactifs de référence : des sérums et des antigènes. Ces réactifs sont produits par les laboratoires de référence affiliés à l'OMS après la sélection annuelle des souches de références. La production et l'évaluation de ces réactifs est limitante pour la production des lots de vaccin (voir **Figure 13**). La production des sérums de référence nécessite la génération de HA clivée par la bromélaïne afin d'obtenir des préparations contenant exclusivement le domaine extracellulaire de la HA. Ces dernières sont ensuite injectées chez l'animal. Certaines mutations du site de clivage ont pu bloquer la production de ces antisérums, comme ce fut le cas pour la souche pandémique H1N1 de 2009 (62). On peut aussi observer une variabilité dans les titres obtenus, au niveau de la réactivité croisée ou de la qualité des disques d'immunoprécipitation formés selon les sérums utilisés (51). Il n'est pas nécessaire

d'utiliser des antigènes issus d'une souche identique à celle contenue dans le vaccin pour la génération de ces sérums, tant que la sensibilité est suffisamment élevée pour permettre une lecture des tests. Cela permet de palier au risque de blocage du procédé dans le cas où la génération annuelle des sérums de référence serait difficile (63).



Le deuxième réactif utilisé est constitué des antigènes de référence, issus de virus partiellement purifiés, inactivés et lyophilisés (*Working Reference Standard* dans la **Figure 13**). Contrairement aux sérums, ce dernier doit être préparé à partir de la souche de travail testée. Ceci peut introduire un délai dans le procédé de production. Le laboratoire de référence produit un premier lot (*Primary Liquid standard ou PLS*) évalué à l'aide d'un dosage des protéines totales et d'une analyse de la quantité relative en HA par densitométrie SDS-PAGE. Ce lot PLS pourra par la suite être utilisé pour calibrer les réactifs de référence, produits et envoyés par un producteur. Ainsi, le lot de PLS et le réactif de travail candidat sont envoyés à au moins 3 laboratoires de référence afin d'être calibrés, de déterminer la qualité des zones d'immunoprécipitation et la gamme de travail analytique (51).

Les avantages et limitations de la SRID sont détaillées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Avantages et limitations du dosage d'activité par SRID. A partir de (61) et (51)

Avantages	Limitations
<u>Simplicité</u> <u>Robustesse</u> <u>Reproductibilité</u> • Coefficient de variation géométrique inter-laboratoire < 10% • Ecart-type relatif : 5-20% (64,65) <u>Mesure de la HA active</u> (61,66) : • Pertinence de la mesure biologique • Corrélation avec l'immunogénicité • Permet une évaluation de stabilité	• Production de réactifs de référence souches-spécifiques : ◦ Sérums (production ~4 mois) ◦ Antigènes de référence • Reformulation annuelle des réactifs de référence • Peu adapté à des préparations vaccinales non issues de production par ovoculture • Sensibilité limitée (LOQ ~ 5 µg HA/mL) • Applicable uniquement en fin de procédé avant la formulation • Durée : 1-2 jours
Biais de standardisation des réactifs de référence	→ Solutions proposées
• Co-migration de protéines autres que HA (jusqu'à 25%) (67) • Influence de la plateforme d'expression cellulaire des réactifs de référence • Influence de la méthode d'inactivation	• Digestion des protéines avant migration (68,69) • Réalisation de réactifs de références spécifiques à chaque plateforme (70)

Les travaux qui ont entraîné en 1977 l'adoption de la SRID en défaveur de l'hémagglutination montrent une corrélation relativement médiocre entre les titres SRID et l'immunogénicité vaccinale jugée par le degré de séroconversion (19,33) (voir **Figure 14**). Comme le souligne l'EMA : à l'heure actuelle, il « n'existe pas de corrélat exact entre l'activité vaccinale et le résultat clinique (efficacité), puisque ce dernier dépend de la nature du vaccin (ex : entier, sous-unitaire, recombinant), de sa formulation (ajout d'adjuvant), du procédé de production, de la voie d'administration ou de la correspondance entre la souche vaccinale et circulante. Il y a une absence de réelles études concentration-réponse, une variabilité des dosages sérologiques et un manque de connaissances pour l'établissement de corrélats de protection plus significatifs » (lignes directrices de l'Agence Européenne des Médicaments – Module Qualité vaccin influenza – § 4.1.1.1.8 *Vaccine standardisation* (71)).

La SRID étant la technique de référence actuelle, il est communément admis que les alternatives doivent être évaluées en comparaison de cette dernière (33,51,70). Cependant, du fait du faible

degré de corrélation entre les titres SRID et l'immunogénicité vaccinale, K. Rowlen a proposé d'évaluer les techniques alternatives, non en les comparant à la SRID, mais directement en dressant des corrélations avec l'efficacité clinique (33). Face à l'émergence de stratégies vaccinales alternatives à l'ovoculture, les réponses envisageables sont : a) évaluer/adapter la technique SRID et les réactifs de référence à chaque nouvelle préparation vaccinale, b) développer des techniques alternatives et/ou orthogonales à cette dernière (41).

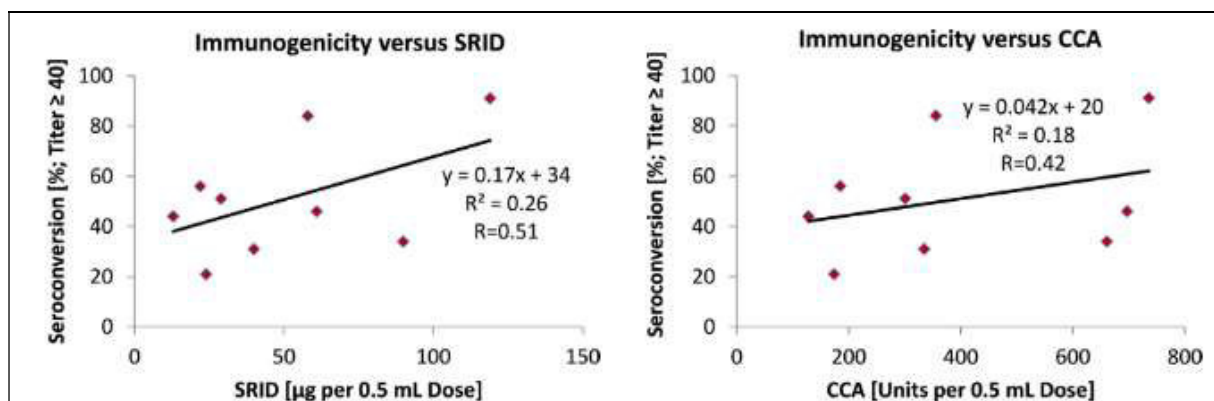


Figure 14 : Corrélations obtenues par Ennis et al. (1977) entre le degré de séroconversion et l'activité vaccinale mesurée par SRID ou hémagglutination (CCA = Chicken Cell agglutination). Tiré de (33) d'après (66).

II.1.3.4. Les techniques analytiques alternatives

Pour pallier aux différentes limitations de la technique de référence, décrites précédemment, les communautés industrielles et académiques travaillent au développement de techniques analytiques alternatives, poussées par les instances réglementaires (51,72). Il est admis qu'un candidat remplaçant la SRID comme dosage d'activité vaccinale se doit de présenter différentes caractéristiques détaillées par Minor et listées ci-dessous (33,35,51) :

1. Permettre la mesure d'un paramètre biologique pertinent permettant d'indiquer l'activité, la stabilité et l'efficacité clinique.
2. Être jugé suffisamment juste et précis au niveau des performances analytiques
3. Être suffisamment rapide pour permettre le suivi en temps réel des procédés
4. Être spécifique du type et sous-type viral
5. Avoir une large gamme analytique afin de permettre le dosage des formulations vaccinales faiblement dosées
6. Evaluer différents types de vaccins tels que ceux qui pourront être produits durant une pandémie grippale (substrats cellulaires et conformation antigénique variable)
7. Il devra soit :

- a. Ne pas requérir de réactifs spécifiques*
 - b. Requérir des réactifs inchangés en fonction des souches*
 - c. Requérir des réactifs spécifiques mais relativement faciles à produire*
8. *Il doit être facile à mettre en place dans les pays en cours de développement*

Bien que la SRID réponde aux points 1,4 et 8, et au point 2 de façon discutable, il a été proposé un certain nombre de méthodes analytiques alternatives afin de pouvoir potentiellement répondre à l'ensemble de ces exigences.

II.1.3.4.1. Les techniques analytiques physicochimiques

Ces techniques analytiques sont majoritairement basées sur la chromatographie. Celle-ci a été utilisée dans les procédés de purification de vaccin dans les années 1980 pour séparer le virus influenza ou la HA de différents contaminants en fonction de la taille ou de leurs caractéristiques physicochimiques (73,74). Par la suite, ces techniques ont été appliquées à une visée analytique pour la caractérisation et le contrôle qualité des lots (64). Les techniques physicochimiques ne requièrent pas, par nature, de sérums de référence développés pour la SRID.

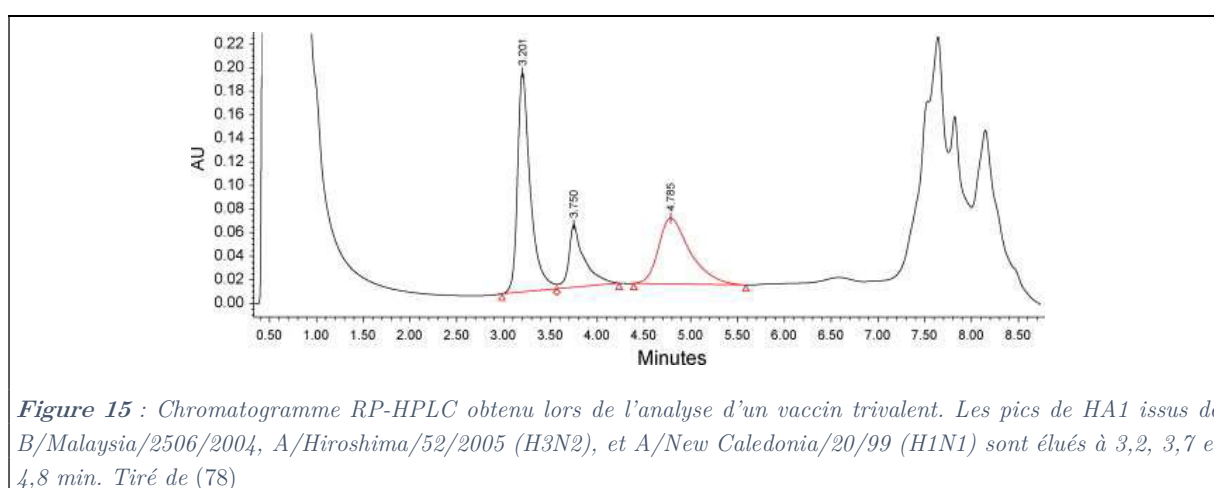
- **L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) couplée à la densitométrie**

Durant la pandémie de 2009, la SDS-PAGE couplée à la densitométrie a été évaluée comme dosage afin d'accélérer la mise sur le marché du vaccin pandémique en Chine (46,69,75). Bien qu'utile comme solution de repli en situation d'urgence pandémique, ce test ne quantifie pas la HA active. Il est peu spécifique (ne distingue pas les sous-types, induit des biais potentiels par co-migration des protéines) et est d'avantage recommandé pour de l'optimisation de procédés (76).

- **La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC)**

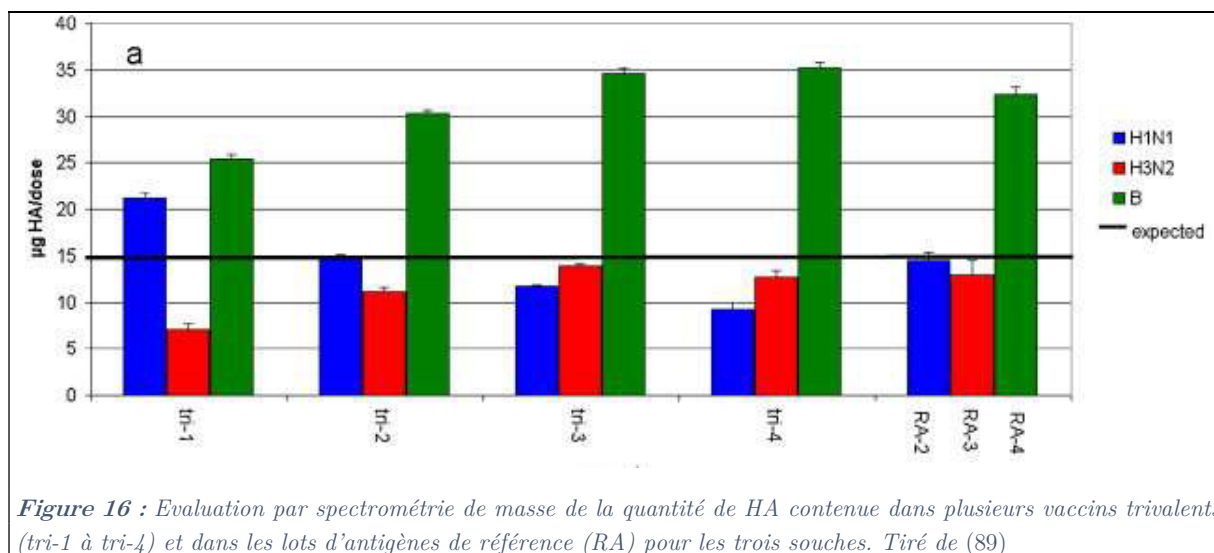
Suite au développement d'une nouvelle méthode où les constituants viraux ont été caractérisés et quantifiés par RP-HPLC (77), plusieurs études rapportent l'utilisation de la chromatographie HPLC en phase inverse pour la quantification de HA dans différentes formulations vaccinales (78-81). Le principe est l'évaluation quantitative d'un pic d'élution correspondant à la sous-unité HA1 de HA (78) par détection UV (77,78) ou de fluorescence (82). L'échantillon est pré-traité avant l'analyse. Les protéines sont solubilisées par fragmentation par du Zwittergent 3-14

et par la trypsine afin de libérer la sous-unité HA1. L'ajout d'agent réducteur (DTT) permet de rompre les ponts disulfure entre les sous-unités HA1 et HA2 (78). De ce fait, la méthode ne quantifie pas directement la HA sous sa forme active. L'étape de protéolyse permet d'obtenir une meilleure corrélation avec les titres obtenus en SRID (64). La sensibilité de la méthode est relativement élevée (LOD : $0,25 \mu\text{g HA.mL}^{-1}$) (78). Du fait des différences dans la structure primaire, et en termes de glycosylation entre les différents sous-types, il est possible de distinguer les HA de différents sous-types dans les préparations vaccinales par RP-HPLC (78,83). Wen et al. ont démontré qu'il était ainsi possible de mesurer la quantité de HA de vaccins multivalents et d'obtenir des résultats avec une bonne corrélation avec la SRID (81).



- **La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)**

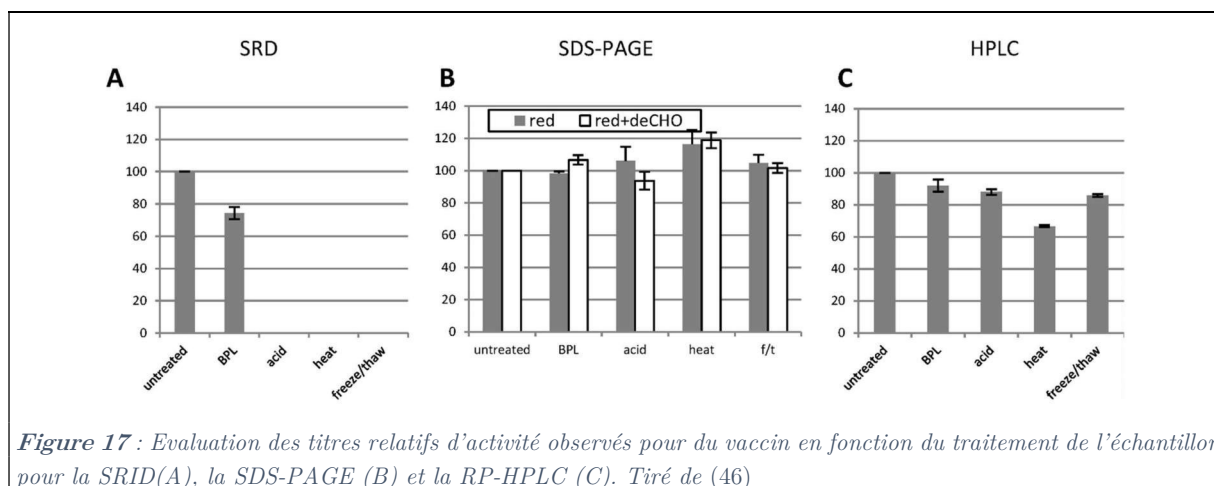
Pour les analyses de virus influenza, la spectrométrie de masse peut être couplée à la chromatographie liquide afin de purifier, potentiellement préconcentrer, et diafiltrer les peptides d'intérêt issus de la protéolyse des échantillons (64). De nombreuses méthodes ont récemment été développées pour la quantification des protéines virales d'influenza (84-89). L'analyse quantitative se base sur la détection de peptides d'intérêt après trypsination de l'échantillon avec ajout d'un étalon interne de peptides marqués (85). La technique permet également une évaluation qualitative des lots de vaccins. Elle permet de quantifier les autres protéines présentes dans les lots de vaccins, dont des contaminants identifiés en tant qu'attributs de qualité critiques et qui doivent être présents dans les limites réglementaires (ex : ovalbumine $< 2\mu\text{g}/100 \mu\text{g HA}$) (88,89).



Comme l'ont montré Creskey et al. (89), le fait de ne pas dépendre d'antigènes de référence permet de ne pas propager l'erreur potentielle lors de la standardisation de ces derniers sur les lots formulés. Par exemple, comme illustré dans la **Figure 16** : ici l'analyse a démontré la sous-évaluation de la quantité de HA/B du lot d'antigène de référence. Il est également possible de doser l'activité NA par UHPLC-IDMS (90).

• Avantages et limitations des techniques physicochimiques

Le principal avantage de ces techniques est que la quantification de HA, sur la base de caractéristiques physicochimiques, limite la propagation d'erreur due à une mauvaise calibration des réactifs. Cependant, comme pour toutes les techniques de protéomique, il est nécessaire d'obtenir une digestion totale de l'échantillon par la trypsine avant l'analyse afin de ne pas entraîner une sous-estimation des titres obtenus (88). Également, les multiples étapes préparatives peuvent entraîner des erreurs systématiques et/ou aléatoires pouvant entacher la fiabilité des données obtenues (64). Elles requièrent aussi une expertise technique et un coût d'instrumentation supérieures à la SRID. Engelhardt et al. ont comparé la capacité de la RP-HPLC et la SDS-PAGE à évaluer la forme native de la HA (46). Ils ont ainsi confirmé que ces techniques ne permettaient pas de distinguer les différentes formes de HA : active ou inactivée par différents traitements (voir **Figure 17**). Des stratégies ont cependant récemment été mises au point pour permettre de quantifier la HA sous sa forme active. Elles sont basées sur des étapes additionnelles de pré-digestion sélective de HA par la trypsine (81,85) ou d'immunocapture (86,87).

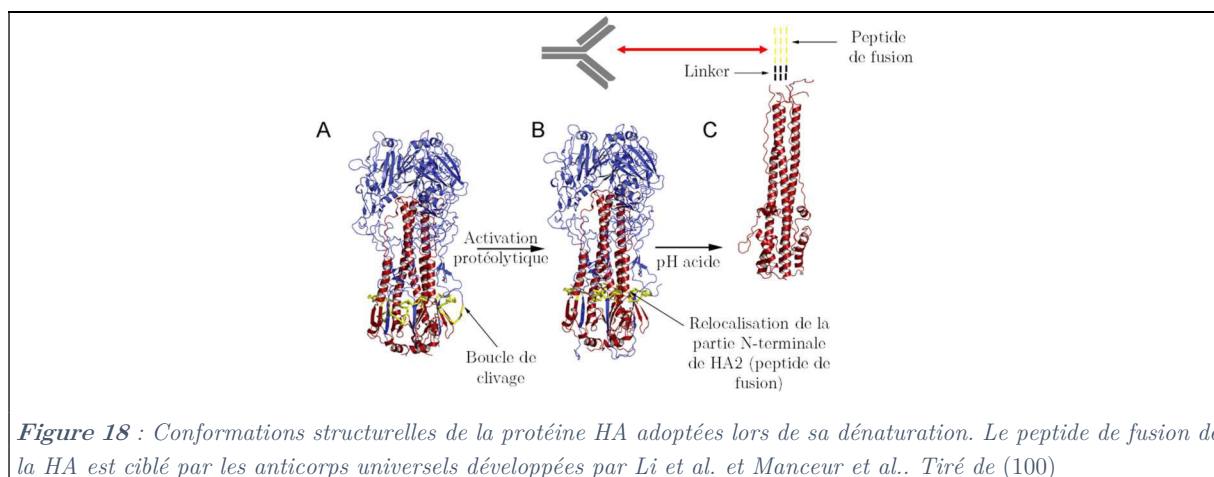


II.1.3.4.2. Les techniques basées sur l'affinité

- Les techniques basées sur les interactions antigène-anticorps

Différentes techniques ont été développées, soit basées sur les sérums de référence, soit sur des anticorps spécifiques aux différentes souches, ou bien sur des anticorps universels anti-HA. Ces techniques immunologiques sont plus sensibles et reproductibles que la SRID (voir **Tableau 5**) mais requièrent également l'utilisation de réactifs de référence (sérums ou anticorps).

Différents tests ELISA ont ainsi été décrits dans la littérature (91–94). Certains de ces tests utilisent des anticorps monoclonaux universels (92) ou souches-spécifiques (91) pour la capture de HA. Li et al. ont développé des anticorps ciblant le peptide de fusion de HA, la seule séquence universellement conservée entre les différents souches de HA (95). Manceur et al. ont développé un test Dot-Blot à partir d'un cocktail de deux anticorps universels et ont évalué un coefficient de corrélation de 0,8 avec le test d'hémagglutination (96). Buffin et al. proposent un test d'immunoprécipitation sur billes de latex basé sur les réactifs de SRID (97). Le dosage d'activité alternatif à la SRID le plus avancé est le test Vaxarray, développé et commercialisé en 2014 par la société IndevR (98). C'est un dosage multiplex par immunofluorescence détectant HA à l'aide d'un test de configuration ELISA sandwich (voir partie III.2.1 du chapitre 3). En 2019, la firme a publié l'évaluation d'un test similaire permettant la quantification de la neuraminidase virale (99).



- Avantages et limitations des techniques basées sur les interactions antigène-anticorps

Beaucoup de techniques immunologiques alternatives apparaissent plus avantageuse que la SRID en termes de rapidité et sensibilité (cf. **Tableau 5**). Néanmoins, contrairement aux méthodes physicochimiques, ces tests immunologiques ne fournissent pas de quantification absolue et nécessitent des réactifs de référence de concentration connue pour évaluer l'activité vaccinale, ce qui implique des biais potentiels (voir **Figure 16**). Comme il a été détaillé plus haut, en plus de représenter une limitation au développement de nouvelles stratégies vaccinales, les réactifs de référence développés pour la SRID sont également un obstacle au développement de nouvelles techniques immunologiques. Face à ce constat, la société InDevR a récemment évalué la capacité du test vaxarray à prédire l'immunogénicité vaccinale, en obtenant des résultats semblables à la SRID.

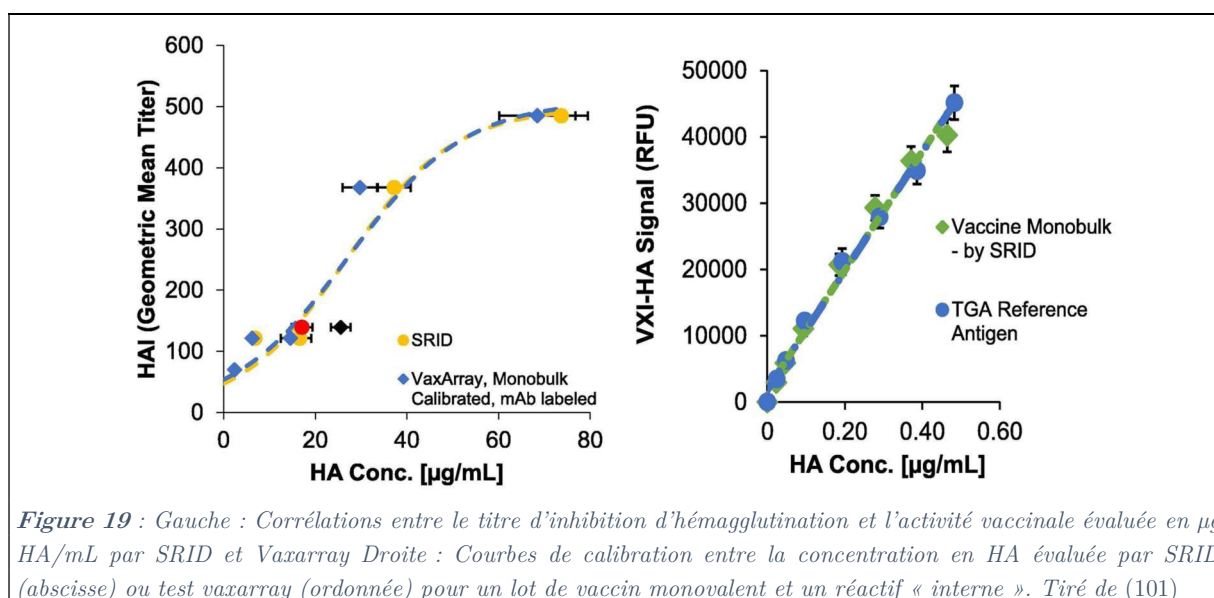
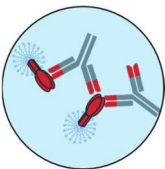
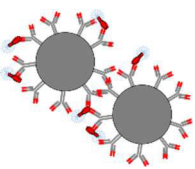
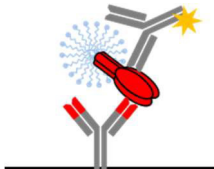
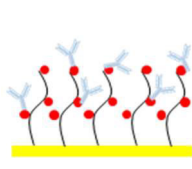
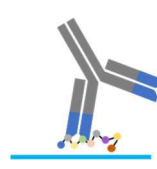
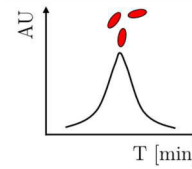
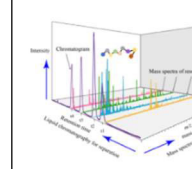
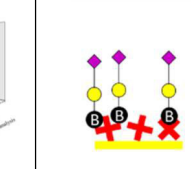


Tableau 5 : Comparatifs des différentes techniques analytiques alternatives à la SRID développées pour la quantification de l'hémagglutinine virale d'influenzae. N.C. : non communiqué. LTD : Limited trypsin digestion ou digestion limitée par la trypsine = étape de pré-digestion sélective de la HA dénaturée

Type	Anticorps-dépendante					Anticorps-indépendante		
	Souches-spécifiques				Universelles			
Technique	SRID	LAA	ELISA/ Vaxarray	SPR/BLI	Dot-Blot	RP-HPLC	HPLC-MS	SPR/ELISA
Principe								
Sensibilité (LOD/LOQ)	LOQ : 3-5 µg/mL	LOD : 0,015 µg/mL LOQ : 2-3 µg/mL	LOD : 0,01 µg/mL	LOD : 0,5 µg/mL	LOD : 0,006 µg/mL	LOD : 0,25-1 µg/mL	LOD : 1 µg/mL	LOQ : 0,1 µg/mL (93)
Gamme analytique	[5 – 30] (6x) µg/mL	[2 – 51] (25x) µg/mL	ELISA : [2 – 51] µg/mL Vaxarray : [0,01 – 0,6] (150x) µg/mL	[1–15] (15x) µg/mL	[0,006–0,6] (1000x) µg/mL	[2,5 – 100] (40x) µg/mL	(16x)	[0,33–30] (100x) [0,1–10] (100x)
Erreur relative (% CV)	5 – 15 %	8 – 9 %	Vaxarray : 8 – 10 %	2 – 5 %	3,5 %	4 – 8 %	5 – 10 %	2-7%
Réactifs requis	Sérums + antigènes	Sérums + antigènes	Antigènes + anticorps (propriétaires)	Sérums + antigènes	Antigènes + anticorps universels	Antigènes	+/- Lots de peptides de référence	Glycanes + Antigènes
Souche-spécifique	OUI	OUI	OUI	OUI/NON	NON	OUI	NON	NON
Evaluation de l'activité	++	++	+++	++	-	- / ++ (LTD/immunocapture)	- / ++ (LTD/immunocapture)	+++
Durée d'analyse	~ 2 j	<2h	2 h	~ 9 h	~ 5h	N.C.	N.C.	<1h
Sources	(76)	(97)	(70,92)	(102)	(95,96)	(83)	(84,86,88)	(65,93)

- **Les techniques basées sur l'affinité HA-glycanes**

En parallèle des techniques immunologiques, certains tests analytiques sont basés sur l'affinité de la HA pour les glycanes possédant un résidu terminal de type acide sialique. Cependant, bien que l'évaluation d'affinité relative ou de paramètres cinétiques des interactions HA-glycanes ait fait l'objet de nombreuses recherches (analyse « qualitative »), l'emploi de glycanes comme ligands pour le développement de tests analytiques quantitatifs est peu décrit dans la littérature (voir **Chapitre III**). Deux études rapportent l'utilisation de glycanes synthétiques comme ligand pour le dosage d'activité vaccinale par ELISA et SPR quantitative (65,93). Dans les deux cas, les auteurs ont évalué une meilleure reproductibilité et sensibilité que la SRID. L'utilisation de glycanes permet également une évaluation de l'activité de la HA et des études de stabilité (65,93).

L'emploi de ligand de type glycane pour le développement de test analytique dédié à la quantification de virus entier n'a cependant pas été retrouvé dans la littérature. Enfin, aucune des techniques décrites précédemment n'est adaptée à la quantification en temps réel de particules virales « totales » de manière directe ou indirecte. Les limitations principales sont : le temps d'analyse, les étapes préparatives ou de marquage secondaire, ou encore l'absence de corrélation robuste entre la quantité de HA et le nombre de particules virales présentes dans les échantillons. Comme il va être décrit dans la partie suivante, le suivi *en-ligne* des procédés de production virale passe par l'évaluation de ce paramètre, ce qui nécessite donc l'utilisation et le développement de nouvelles techniques (détaillées dans la partie II.2).

II.2. Au cours du procédé – La stratégie *Process Analytical Technology*

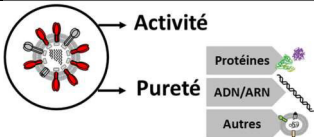
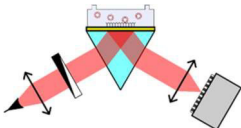
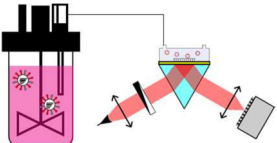
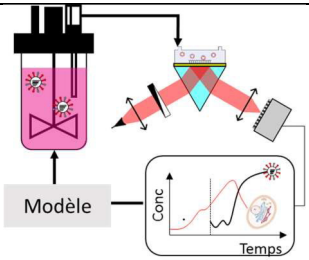
Au cours de ces dernières années, les autorités régulatrices ont initié le développement de méthodes analytiques permettant le suivi des procédés dans le but de moderniser et d'améliorer les pratiques de l'industrie pharmaceutique. Cela s'est traduit par la publication de directives traitant de *Process Analytical Technology (PAT)* par la *Food and Drug Administration* en 2004 (103,104). L'approche PAT est ainsi définie comme « Un système pour concevoir, analyser et contrôler la fabrication à travers des mesures au cours du procédé des attributs critiques de la qualité des matières premières et de la performance des procédés, dans le but d'assurer la qualité du produit final. » (105). Ces documents incitent les industriels à adopter des outils analytiques qui permettent le suivi en-ligne des attributs critiques de qualités (CQA) et/ou des paramètres critiques du procédé pour la qualité des produits finis (ou *Critical Process Parameters* : CPPs) au cours de ses différentes étapes de la production. Le but est alors de maîtriser la qualité et d'améliorer la reproductibilité des productions de biomédicaments. La mise en place de la stratégie PAT dans les bioprocédés implique l'utilisation de nouveaux outils analytiques pour identifier des paramètres critiques et réaliser un suivi et un contrôle du procédé (39,106). Cette démarche a pour but de limiter l'évaluation d'attributs de qualité critique (CQA) en point final en fin de procédé grâce à la mise en place de contrôles réalisés tout au long du procédé. Le **Tableau 6** détaille la terminologie des différents paramètres utilisés au sein de la démarche PAT tandis que le **Tableau 7** indique les différentes étapes à suivre pour l'implémentation de la stratégie PAT lors du développement de méthodes analytiques *in-process*.

Tableau 6 : Définition des paramètres de la stratégie Quality by Design et PAT selon les recommandations du conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH)

Paramètre	Définition
Attribut de Qualité (QA)	Une propriété/caractéristique physique, chimique ou microbiologique du produit dont la variabilité peut entraîner un impact potentiel sur la sécurité et l'efficacité du produit
Attribut de Qualité Critique (CQA)	Une propriété/caractéristique physique, chimique ou microbiologique qui doit être comprise dans une gamme/limite/distribution afin d'assurer la qualité désirée du produit – ICH Q8(R2)
Critères d'acceptation	Limites/Gamme numérique ou autre mesures adaptées afin de valider que le produit/matériel, à différent niveaux du procédé de production, est conforme aux spécifications établies au sujet des résultats des procédures analytiques – ICH Q8(R1)
Attribut de performance (PA)	Une propriété/caractéristique physique, chimique ou microbiologique du produit dont la variabilité peut entraîner un impact potentiel sur la performance du procédé

Attribut clé de performance (KPA)	Un paramètre dont le contrôle permet d'assurer des performances de procédé optimales
Paramètre critique du procédé (CPP)	Un paramètre du procédé dont la variabilité a un impact sur un CQA, et qui doit donc être suivi ou contrôlé afin d'assurer que le procédé atteint le niveau de qualité désiré – ICH Q8(R1)
Paramètre clé du procédé (KPP)	Un paramètre ajustable (variable) du procédé qui, lorsqu'il est maintenu dans une gamme restreinte, assure des performances optimales du procédé. Il n'affecte pas significativement les CQAs du produit
Espace de conception (<i>Design space</i>)	La combinaison multidimensionnelle et les interactions des variables d'entrée et des paramètres de procédé qui ont démontré fournir une assurance de qualité – ICH Q8(R1)
<i>Design of Experiments</i> DoE	Une méthode structurée et organisée afin de déterminer les relations entre les différents facteurs qui influencent le procédé et la production – ICH Q8(R1)
Profil cible de qualité du produit (QTPP)	Un résumé prospectif des attributs de qualité d'un produit pharmaceutique qui, idéalement, sera atteint pour assurer la qualité souhaitée, en tenant compte de l'innocuité et de l'efficacité du produit – ICH Q8(R2)

Tableau 7 : Étapes à suivre dans la mise en place de la stratégie PAT pour le suivi analytique in-process

Etape	Illustration	Description
Détermination de la cible analytique		Evaluer les attributs que l'on souhaite mesurer et où/quand les mesurer au sein du procédé. Mettre en place des spécifications sur les paramètres analytiques attendus à partir des CQAs et du QTPP
Sélection et développement de la technique analytique		Sélectionner la/les techniques analytiques appropriées pour réaliser les mesures. Evaluer les paramètres analytiques de la méthode. Evaluer les CQAs. Evaluer les paramètres critiques du procédé.
Evaluation des risques	Impact : pH, T°, pO2, densité cellulaire à l'infection, MOL...	Evaluer les risques liés à une variation des paramètres (critiques) du procédé.
Développement/validation de la méthode analytique in-process		Examiner les interactions potentielles entre les différentes variables du procédé identifiées (sur la base des outils de <i>design space</i> et DoE). Evaluer la robustesse de la méthode pour le suivi des CQAs.
Stratégie de contrôle		Définir et implémenter une stratégie de contrôle du procédé
Amélioration continue	Suivi des procédés de production/analyse des déviations/optimisation de la méthode	Suivre les performances du procédé et procéder à son amélioration continue pour garantir la qualité du produit.

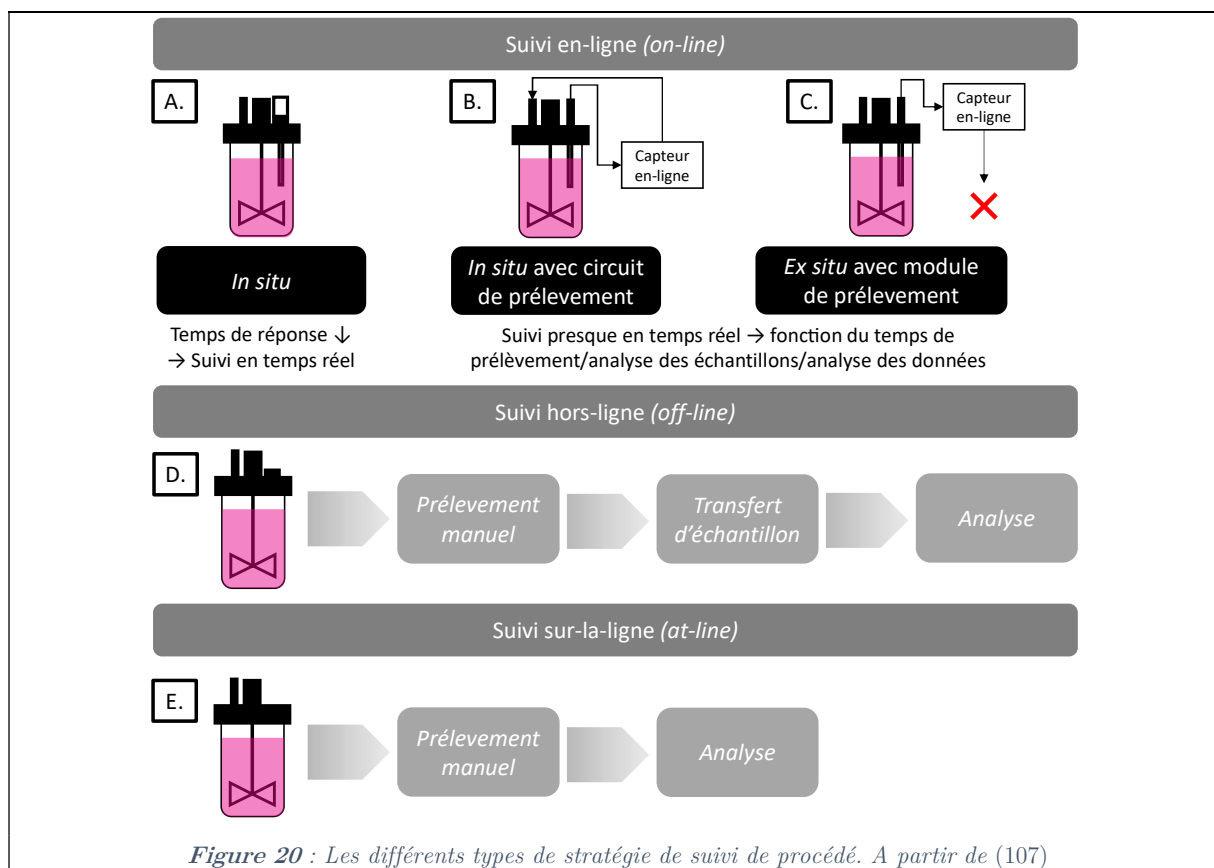
Si l'on s'intéresse uniquement à l'activité vaccinale :

- Les particules virales sont des structures macromoléculaires complexes pour lesquelles les relations structure-activité ne sont pas clairement établies
- La conformation antigénique varie entre les différentes formulations vaccinales (ex : vaccin à base de virus entier atténué, vaccin inactivé à base de virus fragmenté, vaccin à base de HA recombinante) et au cours du procédé de production (inactivation de virus entier par fragmentation durant le procédé).
- Le dosage d'activité vaccinale est réalisé uniquement après « solubilisation » de la HA sous forme trimérique. Ce dosage est réalisé sur les lots de vaccins purifiés monovalents avant formulation.

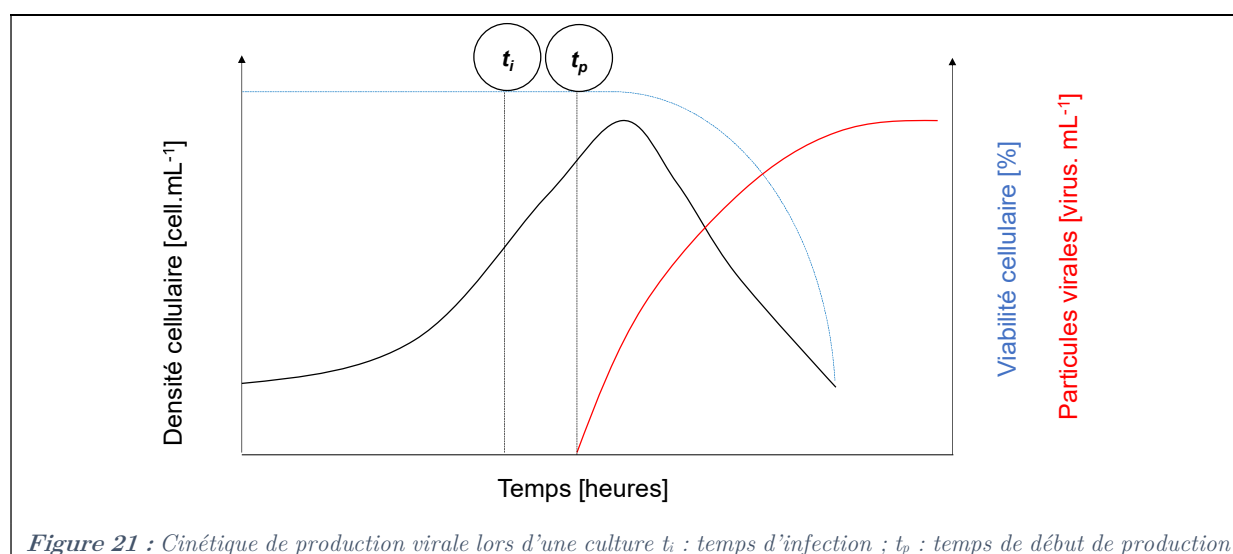
Comme il a été vu précédemment, l'activité vaccinale est modestement corrélée à l'efficacité vaccinale. Le développement de dosages d'activités alternatifs applicables au cours des procédés de production, et donc basés sur l'analyse de virus entiers, est particulièrement intéressant pour l'évaluation des attributs critiques de qualité au sein des procédés de production vaccinaux actuels et en développement. Par ailleurs, l'essor des outils analytiques dédiés à la quantification de particules virales « totales » (voir **partie II.2.1**) permet maintenant une évaluation des performances de ces procédés par l'évaluation de la productivité en particules virales.

II.2.1. L'application de la stratégie PAT dans les bioprocédés de production virale d'influenza

Les mesures analytiques et suivi de paramètres de procédés peuvent être de différentes natures (voir **Figure 20**). Lorsqu'il est réalisé au sein de la zone de production il est appelé *at-line* (sur-la-ligne). Dans ce cas, l'échantillon est prélevé, isolé et analysé à proximité du procédé. L'analyse peut être réalisée *in-line* (en-ligne), l'échantillon est alors prélevé, analysé puis éventuellement retourné dans le procédé), dans la ligne (soit une analyse directement en contact avec le procédé : *in situ*) ou alors hors-ligne (l'échantillon est prélevé, isolé et analysé à l'extérieur de la zone de production) (104). Dans le cadre d'applications PAT, il est nécessaire de réaliser **des analyses dans un intervalle de temps permettant de réaliser des actions correctives/de contrôle du procédé (on parle alors de mesures en cours de procédé ou « *in-process* »)**. Si possible, l'application peut aller jusqu'à une phase de contrôle où les données analytiques sont associées à une boucle de régulation automatisée permettant des performances du procédé et une qualité de produit constantes (104).

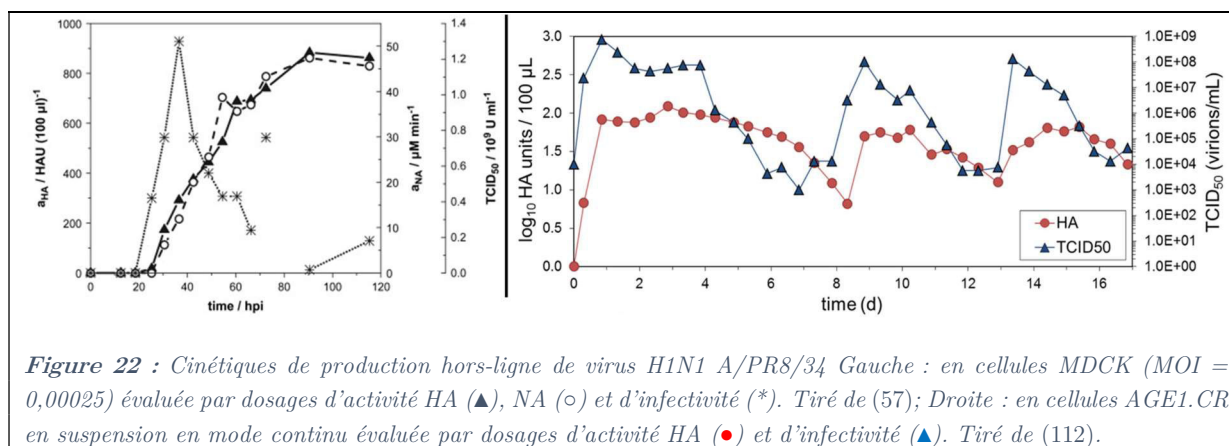


Par ailleurs, la **Figure 21** présente une cinétique de production théorique de virus influenza avec ses différentes phases. Classiquement, le virus est inoculé selon un ratio entre la densité cellulaire au temps d'infection t_i et le nombre de particules virales infectieuses. Ce ratio correspond à la multiplicité d'infection (ou MOI). Suite à l'infection, une production virale va commencer après une période de latence du fait du mécanisme de réplication virale (108,109).



L'infection virale induit une mortalité cellulaire dans la population qui se traduit par une diminution de la densité cellulaire. Pour des MOI faibles, plusieurs cycles d'infection peuvent survenir durant la culture cellulaire.

Plusieurs travaux, basés sur des analyses *hors-ligne*, décrivent les cinétiques de production virales d'influenza dans des procédés basés sur la culture cellulaire (voir **Figure 22**). Kalbfuss et al. ont utilisé des dosages d'activité HA et NA standardisés pour l'évaluation des cinétiques de production virales (57). Ils ont montré un **défaut de corrélation entre les titres en particules virales infectieuses et les dosages d'activité**. Petiot et al. ont eux évalué les cinétiques obtenues en cellules HEK293-SF-3F6 en suspension, démontrant une corrélation entre la productivité cellulaire spécifique en particules virales infectieuses et la variation d'amplitude maximale de la fréquence caractéristique mesurée par sonde à capacitance *en-ligne* (110). Les travaux de Frensing et al. ont eux démontré **l'impact des particules virales non-infectieuses dans les procédés de production vaccinaux**. Ces dernières influent la productivité en particules infectieuses en culture cellulaire, entraînant par exemple des fluctuations périodiques des titres en particules infectieuses dans des cultures réalisées en mode continu (111,112).



Des publications rapportent également le suivi *en-ligne* de cultures cellulaires dédiées à la production virale sur la base de méthodes spectroscopiques *in-situ*, par Raman, fluorescence ou spectroscopie diélectrique (113). Cependant, la quasi-totalité de ces publications ne décrivent pas de corrélation entre la mesure réalisée et les titres en particules virales obtenus. Par nature,

les données spectrales recueillies in-situ ne peuvent pas directement être associées à une variable du bioprocédé et nécessitent différentes étapes de traitement (103).

II.2.2. Les techniques analytiques pour la quantification de particules virales in-process

Une technique analytique permettant de réaliser le suivi *en-ligne* des cinétiques de production virale est un outil d'intérêt pour le développement et l'optimisation de nouveaux procédés vaccinaux basés sur la culture cellulaire. Bien qu'aucune recommandation ne soit émise dans la littérature, on peut résumer ici les caractéristiques désirées pour un tel test :

- Être spécifique des particules virales d'intérêt
- Quantifier des particules virales « totales » (particules infectieuses et non-infectieuses)
- Quantifier des particules virales actives (possédant des protéines HA fonctionnelles)
- Être universel vis-à-vis des souches virales
- Ne pas nécessiter de réactifs de référence. Ou s'il nécessite un réactif, qu'il soit si possible indépendant de la souche virale analysée
- Être applicable en ligne ou in-process :
 - Technique automatisable/système en circuit « ouvert » ou avec passeur d'échantillon
 - Fréquence d'analyse relativement rapide (≤ 1 h) permettant un suivi du procédé
 - Reproductibilité et précision satisfaisante pour une évaluation des cinétiques de production virale (au regard des outils analytiques off-line utilisés actuellement)
 - Sensibilité : limite de quantification (LOQ) permettant un suivi durant les premières phases des cinétiques de production virale

Dans le cadre du suivi des procédés vaccinaux, l'intérêt est de pouvoir quantifier les particules virales *totales* et *actives*. En effet, ce sont ces dernières qui vont contribuer en très grande majorité à l'induction de la réponse immunitaire vaccinale par leurs antigènes libres obtenus après fractionnement ou sous forme entière. Différentes stratégies vaccinales alternatives au procédé traditionnel sont basées sur la production de particules virales entières non infectieuses (par exemple, les particules pseudo-virales/VLPs (34), les particules « défectives interférentes »/DIPs (112)) ou les virus atténués (9). Pour ces procédés en développement, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode d'analyse satisfaisante étant donné que les dosages d'infectivité classiques et ceux basés sur les acides nucléiques ne sont pas applicables. Les techniques analytiques utilisées pour la quantification de particules virales peuvent être divisées en 4 catégories, à savoir les techniques permettant de :

- a) déterminer un pouvoir infectieux
- b) quantifier la présence d'un marqueur d'acide nucléique du génome viral
- c) réaliser un comptage direct des particules par une méthode physique avec ou sans marquage préalable (114)
- d) réaliser un comptage indirect des particules à partir d'un dosage d'activité et de corrélations établies (activité-particules virales, ex : titre HA)

Historiquement, seul la microscopie électronique permettait la détection de particules virales (114). Les dosages d'infectivité constituent la méthode de référence pour une évaluation quantitative des particules virales infectieuses. Ils sont basés sur l'observation d'un effet cytopathique sur un tapis de cellules adhérentes après incubation avec un inoculum du virus à titrer. Ils nécessitent à la fois une permissivité du virus évalué dans la lignée cellulaire utilisée et un pouvoir cythopathogène suffisant pour permettre l'observation d'un effet cythopathique. Deux méthodes de titrage infectieux sont principalement utilisées : la méthode de la Dose Infectante en Culture Tissulaire 50% (DICT₅₀, élaborée par Reed et Muench en 1938 (115)) et la méthode des plages de lyses (ou *Plaque Forming Unit PFU*, élaborée par Dulbecco et Vogt en 1954 (116)). Il existe également une variante basée sur la détection d'une protéine rapportrice fluorescente (FFA pour *Fluorescent Focusing Assay*) après infection et expression par la cellule hôte (117).

Cependant l'arsenal analytique disponible pour la caractérisation et/ou la quantification des particules virales s'est grandement élargi (voir **Tableau 8**). Depuis ces dix dernières années sont apparues des techniques permettant une mesure de la concentration et/ou la taille de nanoparticules en solution (NTA, TRPS, virométrie en flux) avec une résolution accrue par rapport aux techniques préexistantes (diffusion dynamique de la lumière – DLS). De plus, les techniques optiques, comme la NTA et la virométrie, permettent un comptage spécifique des particules virales par une étape de marquage préalable (immunomarquage des antigènes de surface ou marqueurs membranaires fluorescent).

Tableau 8 : Techniques analytiques utilisées pour la quantification des particules virales d'influenza. A partir de (60,114).

Méthode		Durée	Principe	Marquage	Caractéristiques	Gamme analytique	Reproductibilité % CV	Instrument	APPLICABILITE EN-LIGNE	Réf
Dosage d'activité	Titre HA	Heures	Hémagglutination	X	Quantifie <i>indirectement</i> les particules totales actives	$>10^{-6}$	30-40%	X	NON	(53)
Dosage d'infectivité	Plaque de lyse (PFU)	Jours	Effet cytopathogène	X	Quantification des particules infectieuses uniquement	$>10^{-0}$	7%	X	NON	(118)
	Dose infectieuse en culture tissulaire/en œuf (DICT ₅₀ /EID ₅₀)		Effet cytopathogène	X		$>10^{-0}$	27%	X	NON	(118)
	Fluorescence focusing assay (FFA)		Protéine rapportrice fluorescente	X		$>10^{-0}$	N.D.	X	NON	(117)
Dosage d'acides nucléiques	PCR quantitative (qPCR) – RT-qPCR	Heures	Amplification des acides nucléiques viraux	✓	Quantification indirecte/quantification des ARNv libres	$>10^{-0}$	45-130% (55)	Nombreux	OUI	(55)
Dosages des particules virales totales	Comptage d' événements individuels	Jours	Microscopie électronique à transmission (NSTEM)	X	Etapes préparatives longues	N.D.	N.D.	Nombreux	NON	(114)
			Microscopie à force atomique (AFM)							
		Minutes - heures	Virométrie en flux	Double	Rapidité	$10^{-5} - 10^{-12}$	44% (119) 9-31% (120)	Virus counter (Virocyt)	OUI	(119,120)
			Tunable resistive pulse sensing (TRPS)	X	Mesure de la charge et taille	$10^{-5} - 10^{-12}$	6% (121) 24-52% (122)	qNano, qViro (IZON)	OUI	(121,122)
			Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	+ / -	Mesure de taille / Gamme analytique restreinte	$10^{-7} - 10^{-9}$	14%	Nanosight (Malvern)	OUI	(123)
	Comptage global		Flow field fractionation – Multiple angle light scattering (FFF-MALLS)	X	Peu testé sur du virus	$>10^{-6}$	2%	Eclipse/dawn (Wyatt)	OUI	(55,124)
			Résonance plasmonique de surface (SPR)	X	Peu testé sur du virus	$>10^{-6}$	< 3%	Nombreux	OUI	Ce travail

II.2.3. Comparatifs des techniques analytiques utilisées pour la quantification de particules virales

Plusieurs facteurs limitent à l'heure actuelle l'utilisation consensuelle d'une technique analytique pour le suivi des productions virales d'Influenza :

1/ Les **limitations d'ordre analytique** (sensibilité/reproductibilité/gamme de travail, voir **Tableau 8**)

2/ Un **défaut de correspondance entre les titres obtenus par les différentes méthodes**.

Ce défaut de correspondance est attribué au fait que les techniques évaluent différents attributs de la particule virale (voir **Tableau 10**). Les observations principales sont les suivantes :

- La mesure de titre infectieux par différents dosages d'infectivité (DICT_{50} ou plages de lyse) ou par le niveau de transduction cellulaire (FFA) donne des concentrations inférieures par rapport aux méthodes basées sur les acides nucléiques, les dosages de protéines/d'activité ou les dosages de particules totales (114,125). En effet, dès les premières observations en microscopie électronique, Donalds et Isaacs ont obtenu un ratio d'environ $1\text{-}2 \log_{10}$ entre les particules virales « totales » (TP) et les particules infectieuses (IVP) (126). Différentes techniques ont permis par la suite d'évaluer des ratios de l'ordre de 10 à 1000 TP/IVP pour le virus influenza (voir **Tableau 9**).

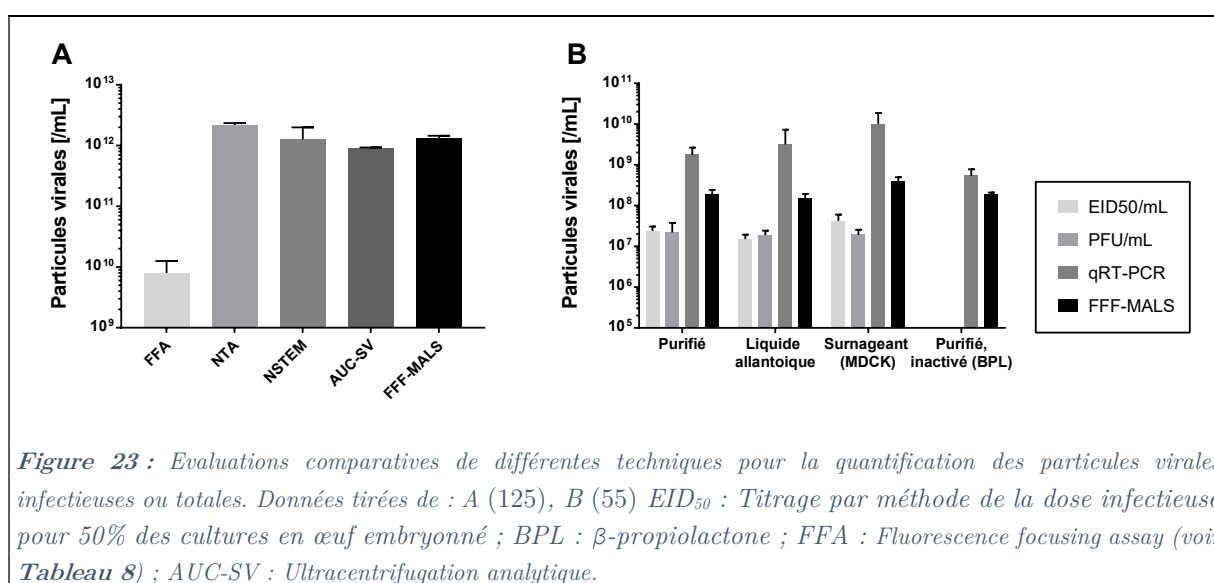
Tableau 9 : Evaluation du ratio entre particules virales « totales » et particules infectieuses pour le virus influenza

Dosage de particules totales	Souche	Dosage d'infectivité	Titre infectieux [IVP/mL]	Titre en particules totales [TP/mL]	Ratio IVP/TP	Source
Microscopie électronique	A/PR/8/34 (H1N1)	EID ₅₀ (dosage en œuf)	X	X	10-100	(126)
		DICT ₅₀	$7,94 \cdot 10^7$	$1,58 \cdot 10^{10}$	200	(124)
	A/California/4/2009 (H1N1)	DICT ₅₀	$3,16 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^{10}$	5000	(119)
FFF-MALS	A/PR/8/34 (H1N1)	PFU	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$	10	(55)
		DICT ₅₀	$7,94 \cdot 10^7$	$2,51 \cdot 10^{10}$	300	(124)
TRPS	A/California/4/2009 (H1N1)	PFU	$(4,5 \pm 0,8) \cdot 10^7$	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^{10}$	400	Ce travail
Virométrie en flux (Viocyt)	A/California/4/2009 (H1N1)	DICT ₅₀	$3,16 \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^{10}$	5000	(119)

- Il existe également un défaut de correspondance entre les titres obtenus par la méthode des plages de lyse et la méthode DICT₅₀ (voir **Matériel & Méthodes** pour le détail des deux méthodes). Un facteur de conversion statistique peut être parfois appliqué :

$F_{\text{DICT}_{50} \rightarrow \text{PFU}} = \ln(2) = 0,69$, basé sur la distribution statistique (loi de Poisson) du nombre de particules virales infectieuses permettant d'obtenir un effet cythopathogène dans 50% des cas. Cependant ce facteur n'est pas retrouvé en pratique et un écart des titres variable de l'ordre de 10-1000x est observé.

- Les évaluations comparatives ont montré que les différentes techniques de dosages des particules totales produisaient des titres du même ordre de grandeur (voir **Figure 23A**).
- Les analyses basées sur la quantification des acides nucléiques viraux entraînent une surestimation des titres obtenus en comparaison des méthodes de dosages des particules totales (voir **Figure 23B**). Différentes explications sont émises comme la détection d'ARN viral libre ou associé aux particules virales (55,119).



3/ Au-delà du défaut de correspondance des titres obtenus pour les différentes techniques analytiques, il n'existe pas à ce jour de technique développée pour la quantification des particules totales et actives (voir Tableau 10).

Tableau 10 : Attributs de la particule virale évalués par les différentes techniques analytiques. N.E. : Non évaluée. *Des réactifs permettant un immunomarquage de l'hémagglutinine sont en cours de développement

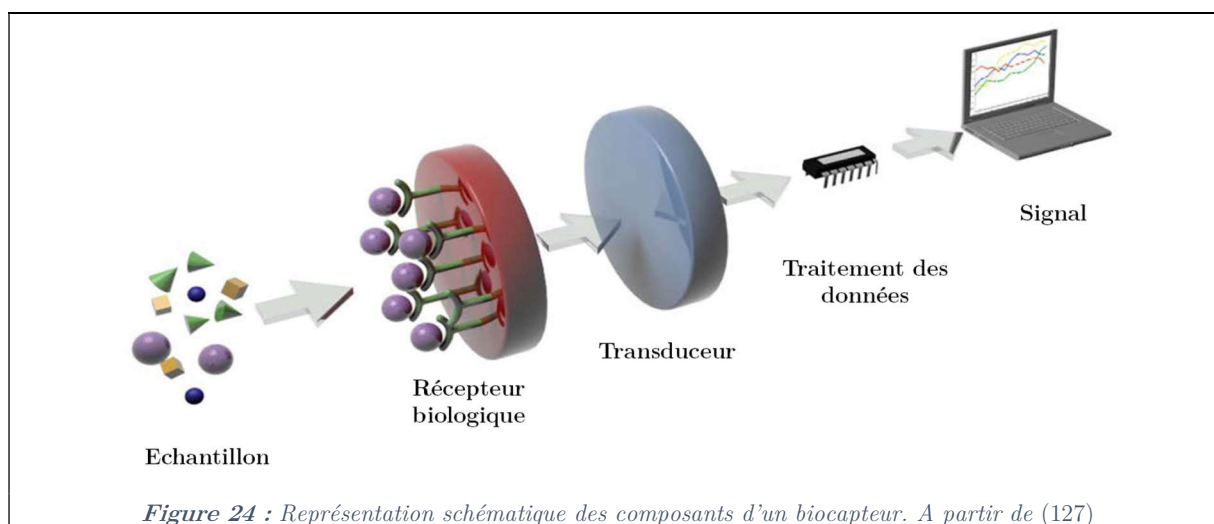
Principe		Particules totales		Acides nucléiques	Particules infectieuses	Hémagglutination	Dosages d'activité HA	
		Sans marquage	Marquage				Basés sur les anticorps	Basés sur les glycanes
Technique		TRPS, NTA	Virométrie	RT-qPCR	PFU, DICT ₅₀	Test HA	SRID	ELISA/SPR
Pré-traitement		NON	OUI	OUI	NON	NON	OUI	OUI
Quantification des particules	Totales	OUI	OUI	NON	NON	Indirecte	NON	NON
	Infectieuses	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	NON
Attribut de la particule virale évalués	Conformation	Directe	Directe	X	Indirecte	Indirecte	X	X
	Présence d'acides nucléiques	X	Directe	Directe	Indirecte	X	X	X
	Présence d'antigènes membranaires	X	Directe (±**)	X	Indirecte	Directe	Directe	Directe
	Activité des antigènes membranaires	X	X	X	Indirecte	Directe	Indirecte	Directe
	Cytopathogénicité	X	X	X	Directe	X	X	X
	Immunogénicité	N.E.	N.E.	N.E.	Évaluée	Évaluée	Évaluée	N.E.

III.

BIOPUCES ET BIOCAPTEURS BASÉS SUR LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE : PRINCIPES ET APPLICATIONS À L'ANALYSE DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES ET À L'ANALYSE QUANTITATIVE D'ANTIGÈNES ET DE PARTICULES VIRALES EN SOLUTION

III.1. Définition du biocapteur

Un biocapteur est défini comme un *dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives par le biais d'un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction* (définition de l'IUPAC).

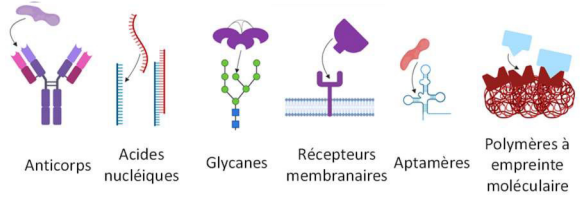


Le récepteur biologique peut être de nature variée (tissus, microorganisme, organelle, récepteur cellulaire ou biomimétique, enzyme, anticorps, ...). L'interaction spécifique entre l'analyte cible et le récepteur biologique produit un changement physicochimique détecté par le transducteur (128). Le biocapteur se distingue en cela des méthodes analytiques purement physicochimiques (détaillées dans le chapitre précédent) car l'utilisation d'un récepteur biologique permet potentiellement de caractériser l'activité de l'analyte ciblé. Le transducteur produit en retour un signal électrique analogique proportionnel à la concentration d'analyte. Les études réalisées ces 50 dernières années dans ce domaine ont permis de développer un large éventail de stratégies/techniques pour chacune des différentes composantes d'un biocapteur (voir **Tableau 11**).

Historiquement, les premiers biocapteurs à avoir été développés sont électrochimiques. Après avoir développé l'électrode à oxygène en 1956, Clark souhaite étendre le champ d'application de l'électrochimie au suivi d'autres analytes et rendre les capteurs électrochimiques plus intelligents par l'ajout de « transducteurs enzymatiques ». Clark démontre son concept en 1962 par immobilisation de la glucose oxydase sur son électrode à oxygène, permettant ainsi la mesure de

concentration en glucose dans le sang (129). Les évolutions de ce concept ont donné lieu 10 ans plus tard au premier biocapteur à glucose commercial (130). Dans les années 70 et 80, des capteurs basés sur une transduction optique pour la mesure de pH ou de gaz ont par la suite été développés (130). Aujourd'hui, un grand nombre de biocapteurs commerciaux sont toujours basés sur une méthode électrochimique. Cependant, les biocapteurs à transduction optique tendent à être de plus en plus courants. Liedberg et al. ont réalisé les premiers travaux utilisant la résonance plasmonique de surface (ou *Surface Plasmon Resonance* - SPR) comme transducteur dans un biocapteur en 1983 (131). Par la suite, Pharmacia a lancé le premier dispositif basé sur la SPR, BIACore, au début des années 1990, qui a permis le développement de biocapteurs basés sur la SPR (132).

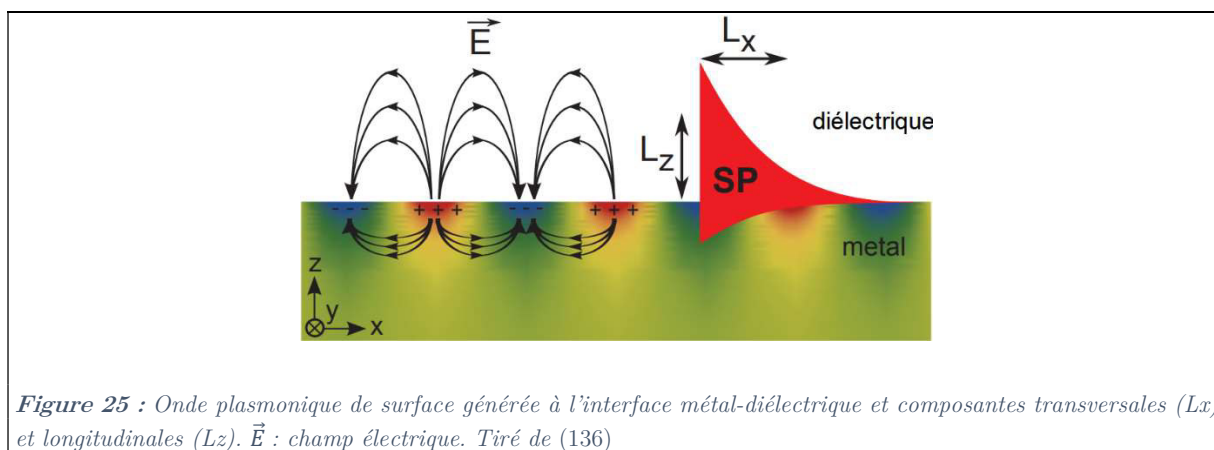
Tableau 11 : Éléments de reconnaissance et exemples de techniques développées dans le champ de recherche des biocapteurs.

Classes	Affinité			Catalytique	Cellulaire
Élément de reconnaissance	 Anticorps Acides nucléiques Glycanes Récepteurs membranaires Aptamères Polymères à empreinte moléculaire			 Récepteurs enzymatiques	 Cellules
Type de transduction	Optique	Mécanique	Thermique	Electrochimique	
Exemples de techniques	• Colorimétrie • Fluorescence • Résonance plasmonique de surface (SPR) • Ellipsométrie • Diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS)	• Microbalance à crystal de quartz (QCM) • Nanoleviers	• Microcalorimétrie • Microthermophorèse	• Ampérométrie • Potentiométrie • Conductimétrie • Impédancemétrie	

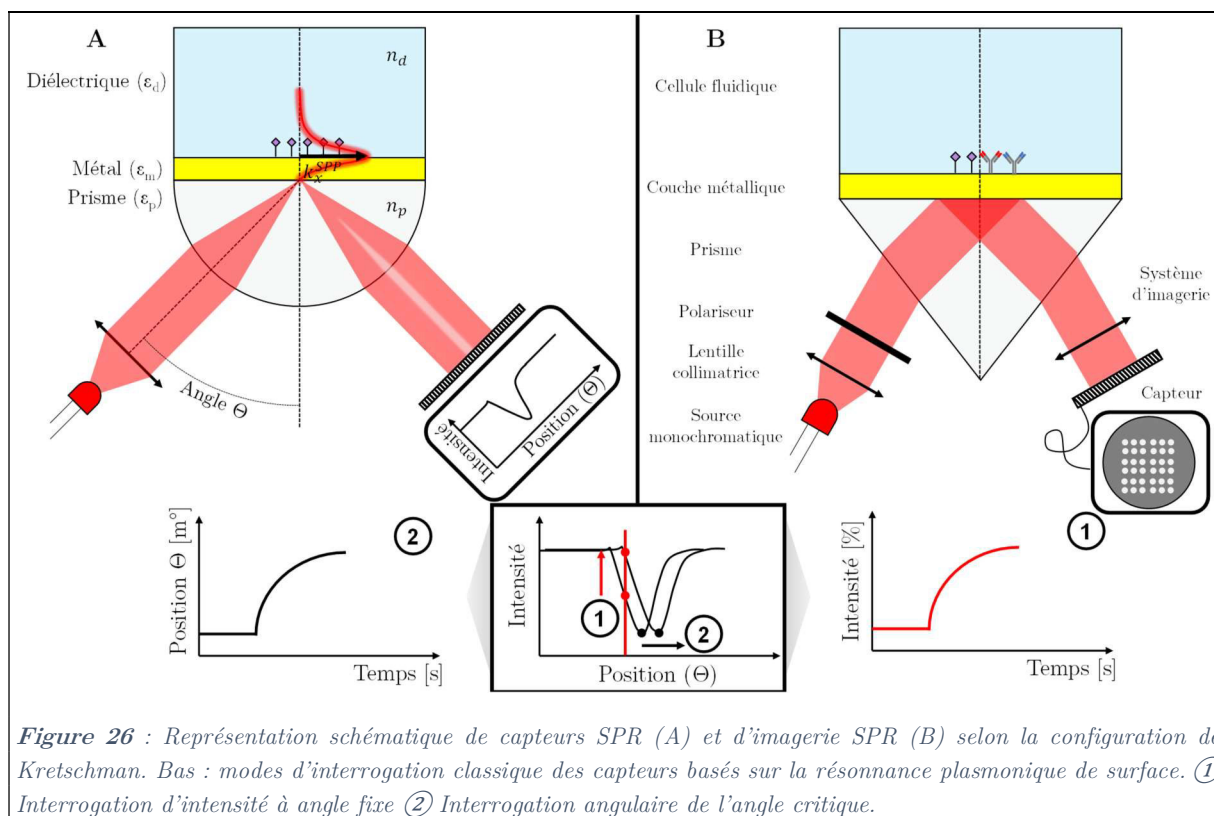
III.2. Biocapteurs par résonance plasmonique de surface

- La résonance plasmonique de surface

La découverte du phénomène de résonance plasmonique de surface date des observations de Wood en 1902. Il fait état d'un motif « anormal » de bandes sombres et claires au niveau de la lumière réfléchie après illumination d'un miroir possédant des réseaux de diffraction. Le formalisme physique de ce phénomène ne remonte qu'à 1968 par les travaux d'Otto, Kretschmann et Raether. Ceux-ci reportent l'excitation de plasmons de surface par différentes configurations, avant la première utilisation en tant que biocapteur en 1983 (133). Le principe physique du phénomène de résonance plasmonique, résultant d'une excitation à l'interface métal-diélectrique, de même que les configurations optiques permettant cette excitation peuvent être trouvés dans la littérature de référence à ce sujet (133–135). Les capteurs basés sur la SPR vont être **sensibles à des variations de l'indice de réfraction du milieu diélectrique dans l'environnement local de la surface du capteur (100-300 nm)**. Cet environnement local correspond à la profondeur de pénétration (L_z) de l'onde électromagnétique de plasmon dans le milieu diélectrique en contact avec la surface métallique fonctionnalisée (voir **Figure 25**).



La **Figure 26** détaille la configuration classiquement utilisée pour les appareils SPR commerciaux où l'excitation des plasmons de surface est réalisée par couplage optique à l'aide d'un prisme (configuration de Kretschman). On remarque qu'il est possible d'évaluer la variation de signal suivant deux modes majeurs dans le cas d'un faisceau incident monochromatique : la variation d'intensité lumineuse réfléchie à angle fixe (①) et l'évaluation de la position de l'angle dit « critique », correspondant au minimum d'intensité du pic SPR (②).



- L'imagerie par résonance plasmonique de surface

L'imagerie par SPR, ou SPRi (parfois appelée microscopie par plasmon de surface) a été inventée à la fin des années 80 et utilisée pour la première fois en 1990 avec une première application biologique en 1990 pour la visualisation de tissus immobilisés sur la surface (137).

Les paramètres utilisés pour caractériser les biocapteurs basés sur les techniques d'imagerie sont la sensibilité, la résolution spatiale, la résolution temporelle et le champ de vision (ou FOV : *field-of-view*) (136). La majorité des systèmes d'imagerie par SPR fonctionnent par modulation d'intensité (cf. **Figure 26B**). Une source lumineuse monochromatique est collimatée par une lentille et passe à travers un polariseur linéaire afin d'obtenir un faisceau incident monochromatique et polarisé. Ce faisceau éclaire la face interne du prisme qui est imagée après réflexion sur le capteur (CCD, CMOS,...) d'une caméra. Les travaux de Maillart et al. ont permis la mise en place d'un dispositif d'imagerie SPR basé sur l'utilisation de prismes dits à « champ de vision très large » et dans des conditions permettant d'imager une surface de $\sim 100 \text{ mm}^2$. Ceci est intéressant pour la réalisation de biopuces multiplexées (138) (voir **partie III.3**). Cette configuration est à la base du système SPRi qui a été commercialisé par la société Horiba-Genoptics et est utilisé au sein du laboratoire GEMBAS.

- **Utilisation de la SPR en tant que biocapteur**

L'utilisation de la SPR en tant que biocapteur est basée sur la variation locale de l'indice de réfraction Δn_b induite par l'association d'un analyte à un élément de reconnaissance (ou ligand) pré-fonctionnalisé en surface du capteur SPR. Cette variation dépend de l'incrément de l'indice de réfraction volumique d'une solution contenant l'analyte $\left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol}$ et de la concentration surfacique d'analyte (135) :

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol} \Delta c_b \sim \left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol} \frac{\Delta \Gamma}{h} \quad [\text{équation 3.1}]$$

Avec Δc_b la concentration d'analyte lié en surface du capteur, exprimée en masse par unité de volume, tandis que $\Delta \Gamma$ correspond à la concentration surfacique d'analyte associé au ligand et h l'épaisseur de la couche dans laquelle se déroule l'association analyte-ligand. La valeur de $\left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol}$ varie suivant la structure des protéines, avec une moyenne de : $\overline{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol}} = 0,190 \pm 0,003 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ (139). Une valeur de $0,177 \pm 0,001 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ a été déterminée pour le virus Influenza (125). Il faut cependant noter que l'approximation de l'équation 3.1 est valable uniquement dans le cas d'un *film mince*, c'est-à-dire lorsque $h \ll L_z$ (140,141).

III.3. Les biopuces

III.3.1. Définition

Une biopuce correspond à l'extension du concept de biocapteur à une analyse multiparamétrique. L'évolution des techniques de fonctionnalisation de surface à échelle submillimétrique a permis dans les années 1990 la fabrication de supports permettant l'analyse parallèle d'interactions multiples analyte-ligand.

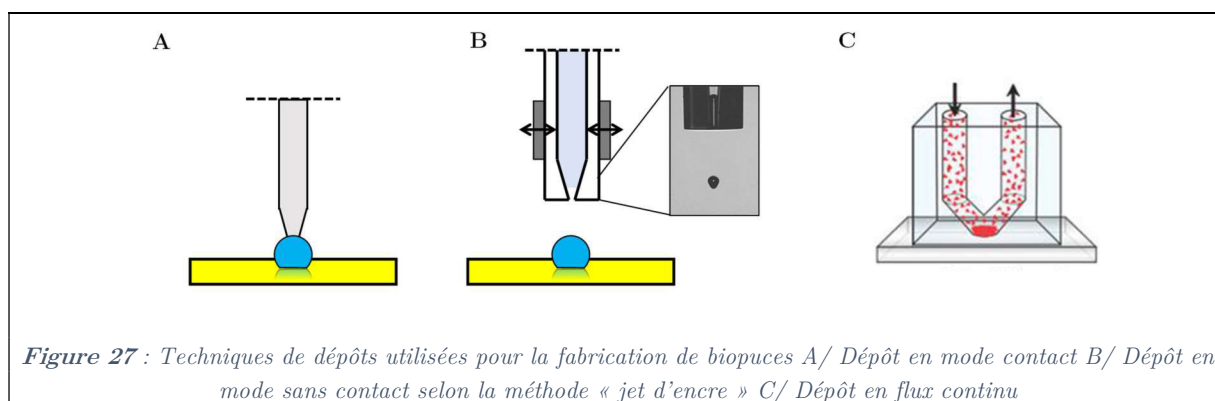
Une biopuce correspond donc à une surface sur laquelle vont être immobilisés un nombre élevé de récepteurs biologiques, séparés spatialement sur la surface. L'intérêt est d'évaluer durant une même analyse plusieurs interactions biologiques en parallèle avec à la fois un temps d'analyse et un volume d'échantillon réduit. Cette technologie a permis l'essor de techniques d'analyse « hautement parallélisées », en particulier pour les acides nucléiques. Les puces « à ADN » ont été les premières preuves de ce concept et constituent maintenant une technologie de référence pour plusieurs applications basées sur la détection et/ou la quantification de séquences

nucléotidiques issues d'échantillons biologiques (diagnostic de pathogènes, analyse des polymorphismes ou étude de profil d'expression génomique, séquençage). Au début des années 2000 sont apparues les biopuces à protéines et les biopuces à glycanes. Ces dernières ont notamment permis de caractériser l'affinité de la HA d'influenza pour un éventail de glycanes synthétisés et immobilisés sur une même surface (142) (voir **Chapitre III**).

III.3.2. Stratégies d'immobilisation et architectures utilisées

III.3.2.1. Techniques de dépôt

L'immobilisation localisée de ligand sous la forme de plots à la surface d'un biocapteur peut être réalisée à l'aide de différentes techniques, détaillées dans la **Figure 27**. Les solutions de ligand peuvent être déposés suivant un mode « contact » ou « sans contact ». Les dépôts en mode contact se font à l'aide de micro-pointes ou micro-tampons. Le dépôt sans contact peut lui être réalisé par différentes méthodes, telles que l'électrospray, le dépôt « jet d'encre » ou l'électroadressage (143–145). Il existe également des appareils de dépôt spécifiquement conçus pour la fonctionnalisation de capteurs SPR par dépôt en flux continu à l'aide de dispositifs microfluidiques (146).



III.3.2.2. Stratégies d'immobilisation

Un grand nombre de stratégies d'immobilisation ont été développées pour l'immobilisation de ligands sur des capteurs ou des puces SPR (143,147) (voir **Figure 28**). L'immobilisation doit remplir deux critères : a) l'accessibilité de l'analyte en solution au(x) ligand(s), b) le maintien de l'activité biologique du ligand (143).

- **Adsorption**

Il est possible d'absorber le ligand grâce aux interactions électrostatiques et/ou hydrophobes entre un ligand de nature protéique et la surface. Cela peut être réalisé soit directement sur la surface métallique, soit après ajout d'une couche de polymères d'acides aminés chargés positivement à pH=7 (poly-L- ou poly-D-lysine). Ceci favorise l'adsorption de protéines chargées négativement (à pH>pI), voire de cellules. Des polysaccharides sont également utilisés, comme par exemple des dextrans carboxyméthylés, dont le degré de carboxylation influence la densité surfacique de charge négative à la surface (147). Le pH de la solution tampon utilisée pour l'absorption devra donc être choisi selon le point isoélectrique du ligand utilisé. Cette stratégie est simple mais présente des désavantages particulièrement indésirables dans le cas d'une technique analytique sans marquage comme la SPR. En effet, une désorption du ligand immobilisé de façon non covalente peut survenir, ainsi les autres composés présents dans la solution contenant le ligand peuvent s'absorber de manière non-spécifique sur la surface.

- **Fonctionnalisation de la surface et greffage covalent**

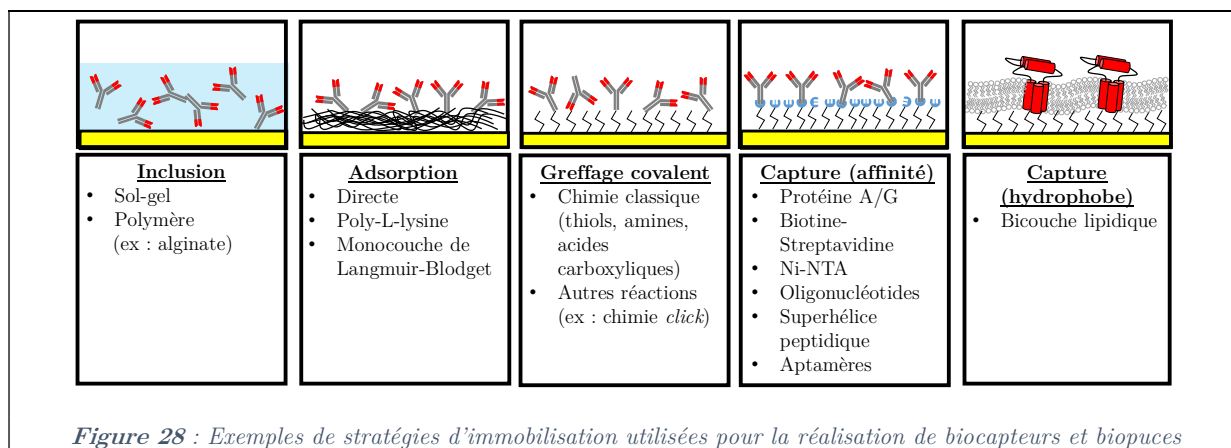
Les capteurs SPR sont le plus souvent fonctionnalisés par formation d'une monocouche. La formation de monocouches auto-assemblées (*Self-Assembled Monolayer – SAM*) est en effet devenue l'une des techniques de référence pour l'immobilisation de biomolécules (148). Celle-ci va remplir différentes fonctions : une passivation de la surface métallique, une modification du caractère hydrophile/hydrophobe de la matrice d'immobilisation, une surface présentant des groupements chimiques définis pour le greffage covalent du ligand (149). L'emploi de polymères (polysaccharides ou polycarboxylates synthétiques) vont permettre la formation d'hydrogels de différentes densités. Une immobilisation covalente du ligand peut par la suite être réalisée par l'utilisation de différentes réactions. Dans le cas de l'immobilisation de protéines, les groupements de la chaîne latérales (et N- et C-terminaux de la protéine) des acides aminés vont être utilisés (le plus souvent de type amine primaire) pour réagir avec différents groupements terminaux des molécules composants la monocouche auto-assemblée (ester, aldéhyde, isothiocyanate ou époxyde, voir (143)) et former une liaison covalente. Dans ce cas cependant, l'orientation spatiale du ligand n'est pas contrôlée.

• Autres stratégies de greffage

Il a également été développé des techniques permettant une immobilisation dirigée basée sur différentes stratégies. L'électro-copolymérisation de ligand et d'un polymère de pyrrole a été développée par Livache et al. (150). Une méthode d'électro-greffage a été développée par Mandon et al. au laboratoire GEMBAS (151). La capture de ligand par affinité permet également une immobilisation dirigée. Différents systèmes affins peuvent être utilisés tels que : des séquences complémentaires d'oligonucléotides, une fonction Ni-NTA et une étiquette poly-histidine, la protéine A/G et le domaine Fc des Igs, l'utilisation de superhélices peptidiques (152) ou d'aptamères. La capture de protéines hydrophobes comme des récepteurs membranaires sous leur forme native peut, elle, être réalisée par inclusion dans une bicouche lipidique suspendue comme il a été développé au laboratoire GEMBAS pour l'inclusion de protéines membranaires couplées aux récepteurs des protéines G (153).

• Inclusion

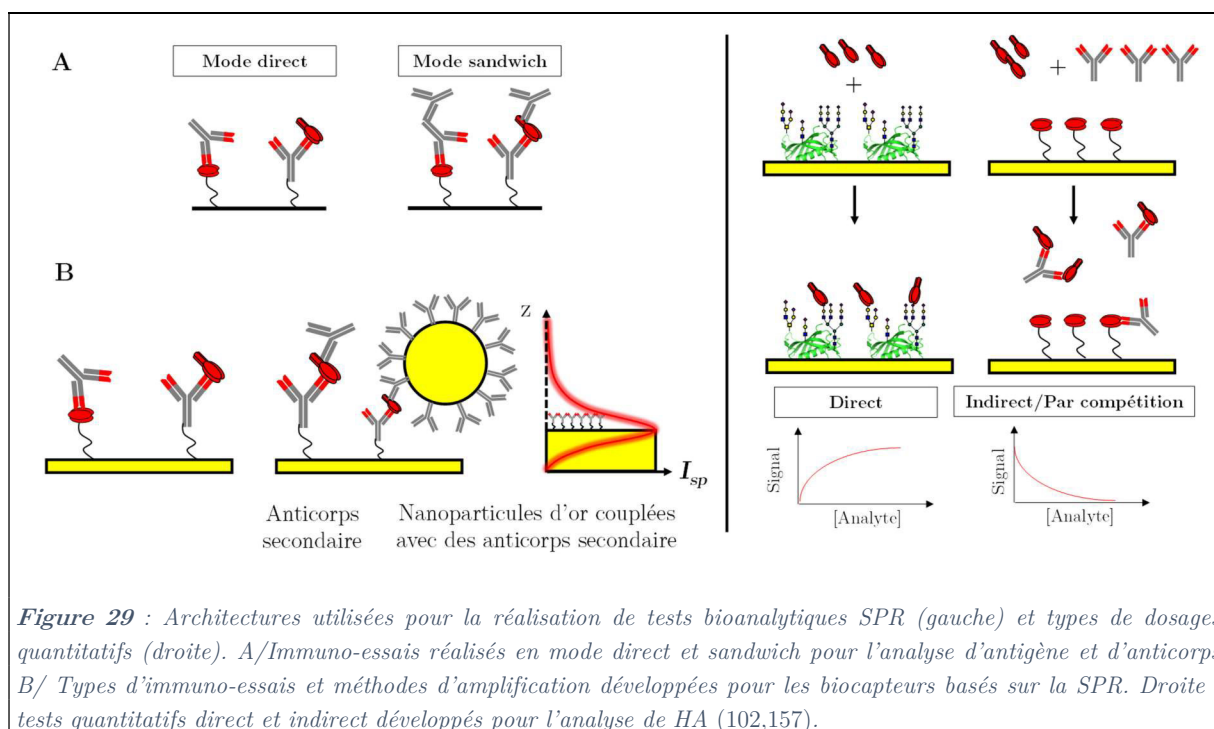
La méthode par inclusion est une alternative basée sur la capture ou le piégeage du ligand dans une matrice constituée d'un polymère insoluble (alginate ou co-polymérisation de pyrrole avec le ligand). Il a par exemple été développé une méthode de dépôt localisé de cellules sur biopuce SPR par inclusion dans une matrice d'alginate par Berthuy et al. (154).



III.3.2.3. Architectures utilisées pour les biocapteurs SPR

La **Figure 29** représente les différents types d'architectures utilisées pour la réalisation de tests bioanalytiques utilisant la résonance plasmonique de surface.

Les capteurs basés sur la SPR, contrairement aux biocapteurs optiques « classiques », ne sont pas sensibles aux variations d'intensité lumineuse émise par des fluorophores liés de façon covalente à un marqueur secondaire. La sensibilité de la résonance plasmonique de surface permet la mesure d'interactions biologiques sans étape de marquage préalable (ou *label-free*). Dans le cas d'analytes de poids moléculaire relativement faible (ex : toxines, molécules thérapeutiques), un marquage secondaire avec des nanoparticules d'or peut être utilisé afin d'amplifier le signal. L'effet d'amplification est ici attribué à la différence d'indice de réfraction des nanoparticules d'or et à un potentiel effet de couplage SPR-LSPR (*localized surface plasmon resonance*) (155,156).



III.4. Biopuces et biocapteurs utilisés pour l'analyse cinétique et quantitative d'Influenza

Différentes biopuces ont été développées pour l'analyse de virus ou d'antigènes membranaires de virus influenza. Le but était d'établir des **relations structure-activité** caractérisant les interactions hôte-pathogène, par l'évaluation de l'affinité relative de la HA pour un panel de glycanes, ou pour **l'analyse quantitative** de la HA. De nouvelles techniques analytiques permettant **l'analyse de nanoparticules uniques** sont de nouveaux outils pour la compréhension du mécanisme d'association du virus influenza à des surfaces biologiques. Cette association permet la calibration de biocapteurs dédiés à l'analyse quantitative de virus (directe et sans marquage).

III.4.1. Analyse cinétique des interactions hémagglutinine-glycanes

III.4.1.1. Importance des interactions protéines-glycanes dans les interactions virus-hôte

Les particules virales sont des complexes protéiques macromoléculaires multimériques. En effet, qu'ils soient capsidiques ou enveloppés, les virus ont pour caractéristiques de présenter une forte densité d'une ou d'un ensemble de protéines à leur surface. Ceci est notamment le cas pour le virus influenza qui présente entre 100-1000 glycoprotéines de HA à sa surface (158). Ces protéines ou les glycanes qu'elles portent vont entrer en jeu dans de nombreuses interactions biologiques hôte-pathogène (159–161) (voir **Figure 30**).

Ces protéines sont donc fréquemment utilisées comme cibles thérapeutiques car elles interviennent en premier plan dans les mécanismes d'infection virale par interaction protéine-protéine ou protéine-glycane au niveau de la membrane cellulaire. Par ailleurs, les glycanes exposés à la membrane cellulaire et possédant un acide sialique en position terminale sont la cible du virus influenza pour l'initiation du mécanisme d'infection virale. Leur densité surfacique est de l'ordre de 50-200 pour 100 nm² (162).

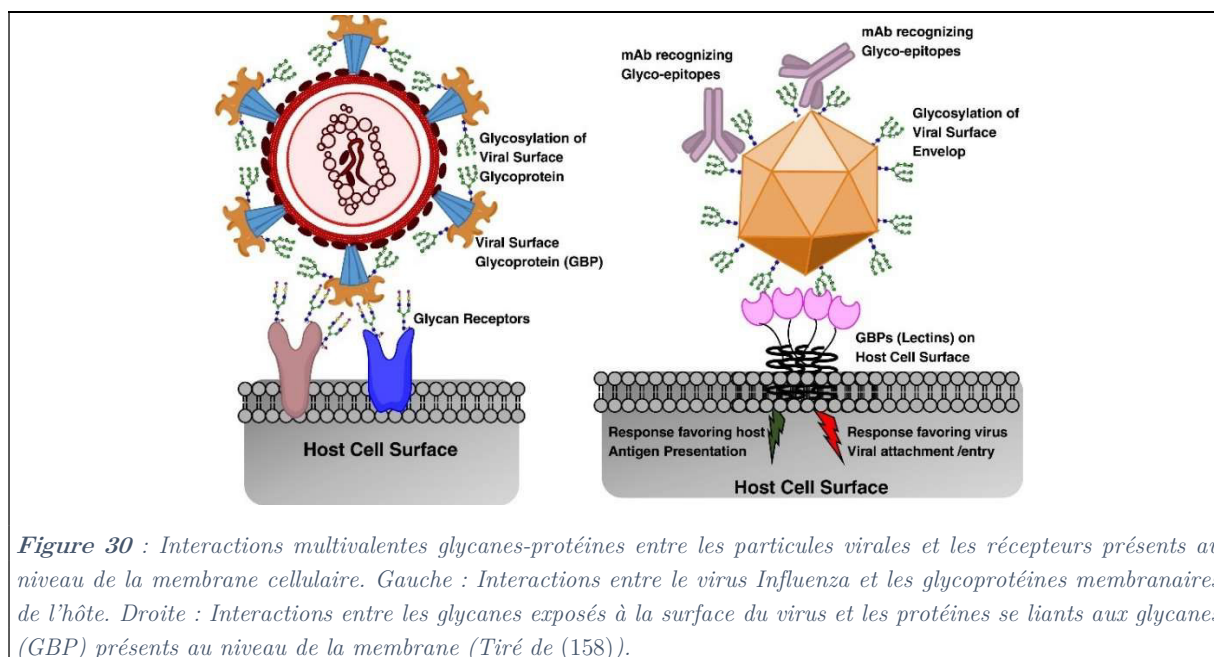


Figure 30 : Interactions multivalentes glycanes-protéines entre les particules virales et les récepteurs présents au niveau de la membrane cellulaire. Gauche : Interactions entre le virus Influenza et les glycoprotéines membranaires de l'hôte. Droite : Interactions entre les glycanes exposés à la surface du virus et les protéines se liant aux glycanes (GBP) présents au niveau de la membrane (Tiré de (158)).

III.4.1.2. Relation structure-activité

Concernant la relation structure-activité des interactions biologiques entre le virus influenza et les glycanes des glycoprotéines membranaires de l'hôte, une tendance a été établie depuis les premières études basées sur l'hémagglutination de particules virales :

- *Le virus Influenza interagit avec la membrane cellulaire par liaison HA-glycanes.*
- *Les souches virales circulantes dans les populations humaines et aviaires s'associent de manière « préférentielle » aux glycanes présentant respectivement une extrémité terminale avec une liaison Sia α 2-6Gal et Sia α 2-3Gal.*

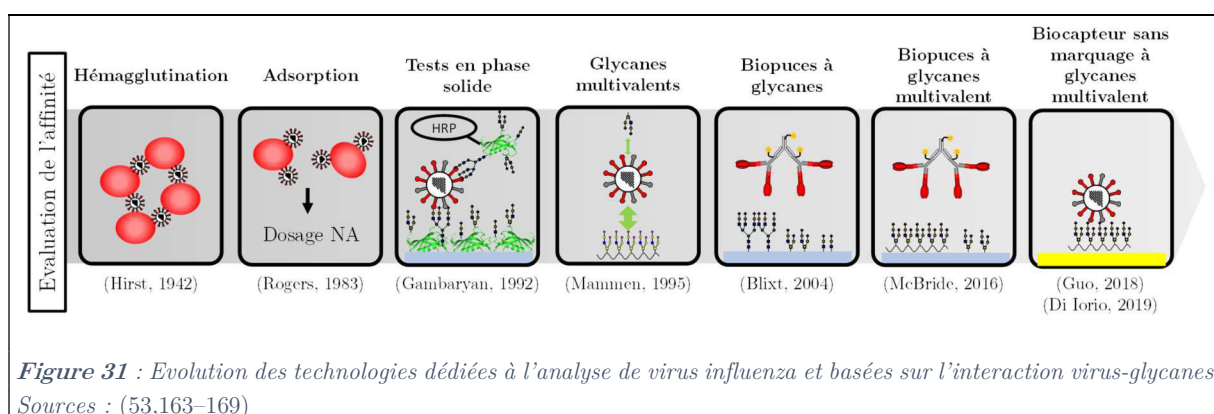
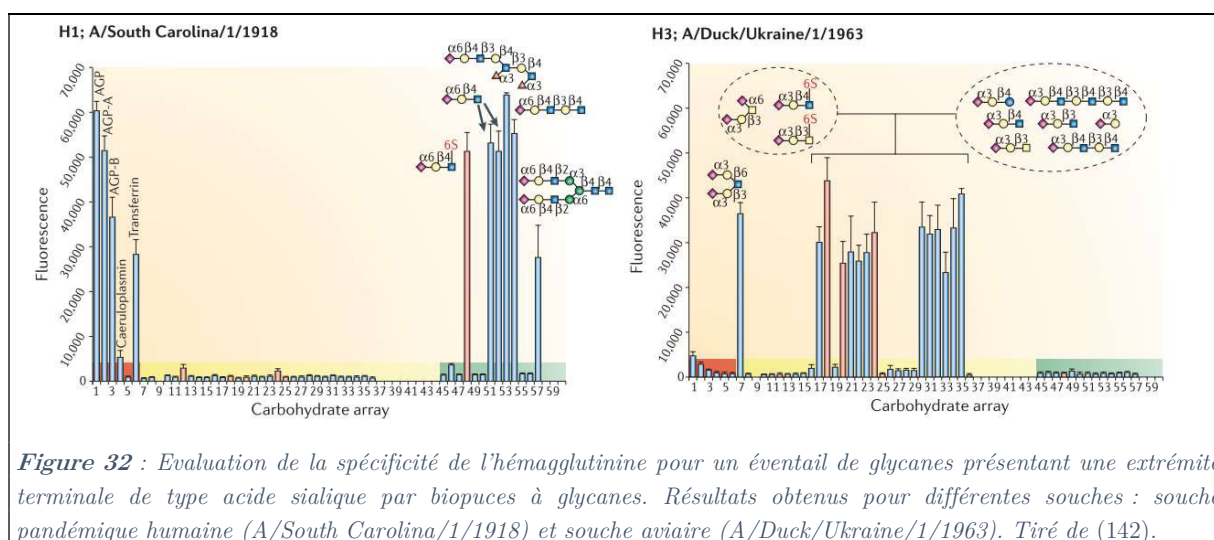


Figure 31 : Evolution des technologies dédiées à l'analyse de virus influenza et basées sur l'interaction virus-glycanes. Sources : (53,163–169)

L'affinité apparente relative de HA pour des glycanes présentant un résidu terminal de type acide sialique a été évaluée pour un large éventail de glycanes et de souches virales. Le Consortium for functional Glycomics a produit et évalué des micropuces à glycanes ayant permis ce criblage dans les années 2000 (**Figure 31**) (166). Bien que ces analyses aient appuyé

les premières observations concernant la spécificité des souches aviaires pour les glycanes présentant une liaison terminale α -2,3 (voir **Figure 32**), cette technique présente de nombreux biais qui rendent une évaluation quantitative directe difficile ; par exemple l'utilisation de marquage secondaires sur rHA couplées à une étiquette poly-histidine, la lecture de fluorescence en point final, l'absence de gamme de calibration externe... (170,171). L'intérêt de ces études était l'évaluation comparative du pouvoir pathogène, de la virulence ou de la transmission de différentes souches virales observé(es) chez une espèce donnée avec l'affinité apparente de la HA de ces souches évaluée pour un panel de glycanes. De manière générale, les tests en phase solide développés à ce jour sont quasi-exclusivement basés sur des méthodes de détection en point final avec un marquage et ne permettent pas une évaluation quantitative directe (171).



Les interactions biologiques entre des protéines et des glycanes sont ubiquitaires et fréquemment retrouvées au niveau des interactions hôte-pathogène. Cependant, l'affinité d'une interaction monovalente entre les glycanes et les protéines est en général relativement faible (K_D de l'ordre du mM). Des interactions multivalentes sont souvent nécessaires afin d'induire une réponse biologique (162). Pour le virus influenza, les rares données quantitatives recueillies sur l'évaluation de l'interaction monovalente glycane-HA (qui ont été réalisées sur du virus entier en phase liquide) sont détaillées dans le **Tableau 12**. À ce degré de valence, on observe **un K_D de l'ordre du mM et une absence de spécificité de la HA pour la liaison α -2,3 ou α -2,6**.

Tableau 12 : Constantes de dissociation de complexe HA – Sialyl-N-acétyllactosamine (SLN) avec une liaison terminale α 2,3- ou α 2,6- évaluées en solution par différentes méthodes (RMN, dosage SPR indirect)

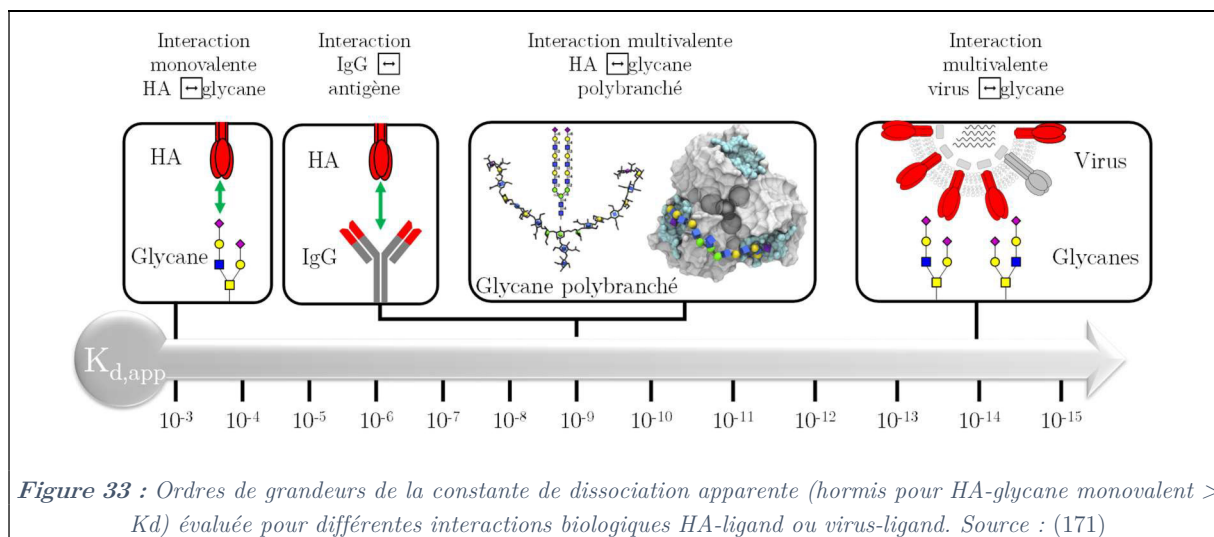
Virus	Ligand	Constante de dissociation K_D (Interaction monovalente)
H1N1 (X-31)	3'-SLN	2,1 $\pm$ 0,3 mM (172) 2,7 $\pm$ 0,01 mM (173)
		3,2 $\pm$ 0,6 mM (174) 3,13 $\pm$ 0,4 mM (175)
	6'-SLN	3,2 $\pm$ 0,6 mM (172) 2,7 $\pm$ 0,07 mM (173)
		2,1 $\pm$ 0,3 mM (174) 2,03 $\pm$ 0,07 mM (175)

Les derniers travaux en date démontrent que la spécificité observée de différentes souches virales pour la liaison α -2,3 ou α -2,6 peut en réalité être partiellement due à des effets d'avidité (171,173,176,177). **L'avidité peut se traduire par le gain d'affinité obtenu par la multivalence des interactions biologiques analyte-ligand.** Ainsi une liaison bivalente peut entraîner une augmentation de l'affinité pouvant aller jusqu'à un K_D apparent : $K_{D,app} = K_{D,mono}^2$ (162)¹. Le développement et l'utilisation de biocapteurs dédiés à l'analyse des interactions biologiques entre le virus influenza et les glycanes (voir **Figure 31**) ont permis de démontrer que :

- La liaison bidentée qui s'opère entre 2 sites de liaisons d'un trimère de HA et les glycanes à structure poly-branchée présentant des liaisons terminales α -2,6 potentialise l'affinité de la HA pour ces dernières (171) (voir **Figure 33**).
- Les multimères ou « rosettes » de HA du vaccin s'associent à 6-9 résidus de type acide sialique, offrant une constante de dissociation apparente $K_{D,app}$ d'environ 10^{-9} M (169).
- Lors de l'association de particules virales entières à une surface présentant des glycanes multivalents, le virus s'associe par l'interaction multivalente de ~ 7 trimères de HA (168). La constante de dissociation apparente évaluée pour les interactions virus influenza-glycanes est alors de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-14} M et dépend de la densité surfacique de glycanes (168,172).
- La constante apparente du taux d'association k_a pour l'association de virus entier à une surface présentant des glycanes multivalents a été évaluée à environ $4.10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (et est similaire pour un ligand 3'-SLN et 6'-SLN et indépendante de la densité surfacique de ligand) (172).

¹ D'autres critères entrent en jeu lors d'interactions multivalentes et complexifient cette relation (voir (162,169,171) dans le cas du virus influenza).

L'affinité apparente des antigènes d'influenza varie selon leur valence par effet d'avidité. Les deux degrés de multivalence des interactions entre les particules virales d'influenza et les surfaces fonctionnalisées par des glycanes entraînent une association avec affinité apparente élevée ($K_{D,app} \sim 10^{-14}$ M).



III.4.2. Analyse quantitative de l'hémagglutinine sous forme trimérique et impact de la valence

Comme il a été vu dans le **chapitre II**, l'évaluation *quantitative* de l'antigène vaccinal HA, initialement réalisée par hémagglutination, est maintenant réalisée par un dosage immunologique (SRID). La société IndevR a récemment développé un dosage immunologique alternatif (Vaxarray) basé sur une biopuce multiplexée. Il s'agit d'un panel de 9 anticorps monoclonaux ciblant différents épitopes, linéaires et conformationnels, spécifiques de différents sous-types de HA qui sont immobilisés sur une microplaque de titrage (178,179). Les échantillons sont pré-traités de manière similaire à la SRID puis déposés et incubés 1h sur la lame avant ajout d'anticorps secondaires universels anti-HA marqués par un fluorophore (178). L'analyse est donc réalisée après marquage secondaire par une lecture en point final (voir **Figure 34A**).

Khurana et al. ont développé un dosage SPR quantitatif basé sur l'utilisation de glycanes (65). Le test est sans marquage et la réponse est ici évaluée à partir du taux d'association (voir partie III.5). Ces derniers ont évalué l'impact du degré d'oligomérisation des multimères de HA sur la réponse SPR (voir **Figure 34**). Ils ont ainsi pu observer que la HA des vaccins commerciaux possède une conformation « oligomérique ». Ceci est conforme aux observations réalisées par

d'autres études biophysiques/structurales où la HA est retrouvée sous forme de rosettes de valence variable (voir (180,181)).

Lors de l'analyse de HA recombinante (rHA) présentant différents degrés de valence, les auteurs ont pu montrer que sous forme monomérique (inactive), la HA ne s'associe pas aux acides sialiques. Lors de l'analyse SPR de rHA sous forme trimérique, oligomérique ou de vaccin, les auteurs qualifient l'association de « similaire ». D'après le profil des sensorgrames, les formes oligomériques semblent offrir une affinité apparente supérieure aux formes trimériques (voir **Figure 34**), bien que des études quantitatives plus poussées semblent requises pour l'affirmer.

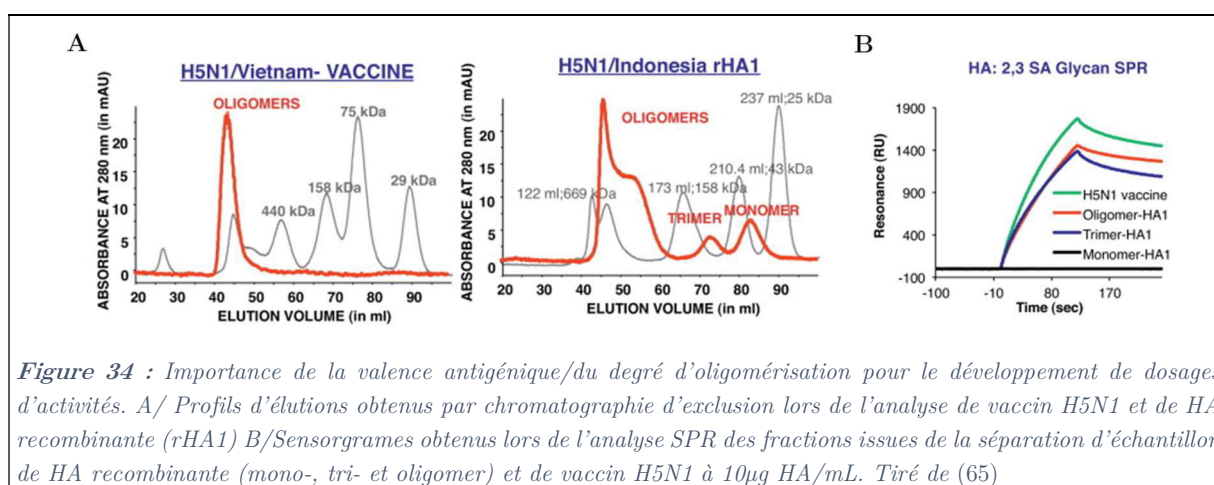


Figure 34 : Importance de la valence antigénique/du degré d'oligomérisation pour le développement de dosages d'activités. A/ Profils d'élutions obtenus par chromatographie d'exclusion lors de l'analyse de vaccin H5N1 et de HA recombinante (rHA1) B/Sensorgrames obtenus lors de l'analyse SPR des fractions issues de la séparation d'échantillon de HA recombinante (mono-, tri- et oligomère) et de vaccin H5N1 à 10 µg HA/mL. Tiré de (65)

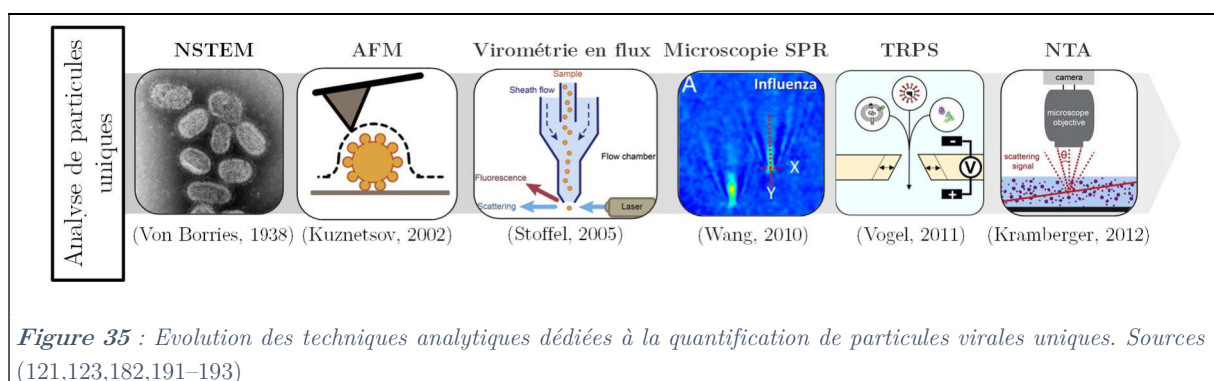
Les tests analytiques développés pour le dosage d'activité vaccinale (ou quantification de l'antigène HA actif) analysent tous la HA sous forme trimérique, après solubilisation des protéines membranaires par traitement avec du détergent. Cela permet d'éviter les biais analytiques potentiels dû aux variations de valence antigénique retrouvées entre les différentes formulations vaccinales ou dans une même formulation.

III.4.3. Des tests biologiques aux biocapteurs digitaux : nouveaux outils pour la compréhension mécanistique de l'association du virus influenza à des surfaces et la quantification de virus

Comme il a été vu dans le **chapitre II**, aucune des techniques analytiques développées à l'heure actuelle ne permet la quantification virus entiers et possédant de la HA active.

Le développement d'outils analytiques ces dernières années a permis de passer d'une détection analogique (par exemple, signal proportionnel à la densité surfacique de biomolécules à la surface du biocapteur) à une détection digitale (comptage d'évènements uniques

d'association/dissociation entre biomolécules et récepteur) pour des analytes dont la taille est de l'ordre de grandeur de la dizaine à la centaine de nm, comme c'est le cas des particules virales ou des vésicules extracellulaires. Ces techniques (NTA, TRPS, virométrie) ont été appliquées à l'analyse des productions virales en termes de particules totales (voir **Figure 35**). Depuis les dernières années, certains travaux évaluent le couplage de ces outils avec l'utilisation de ligands spécifiques afin de développer des biocapteurs « digitaux » sans marquage. La première utilisation de l'imagerie SPR pour l'analyse directe de particules virales d'Influenza sans marquage a été réalisée par Wang et al. en 2010 (182). De nouveaux biocapteurs digitaux par imagerie ont été développés, basés sur l'imagerie SPR (183,184), l'interférométrie (182,185,186), la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (ou *TIRF*) (187–189). Il est à noter également le développement de biocapteurs basés sur le greffage de glycanes au niveau d'un nanopore afin de permettre la détection spécifique de particules virales uniques par effet Coulter (190).



Ces dernières années, l'utilisation de biocapteurs basés sur la SPR ou l'interférométrie et la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (ou *TIRF*) ont ainsi permis de comprendre plus en détail le mécanisme d'interaction du virus influenza à la membrane cellulaire (168,169,172,188,189) :

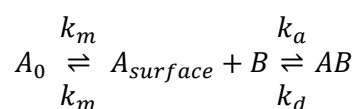
- L'affinité apparente élevée du virus Influenza pour les surfaces fonctionnalisées avec une densité surfacique de glycanes élevée entraîne une liaison quasi irréversible en présence d'inhibiteur de NA (168,172,187).
- Le temps nécessaire pour atteindre un état d'équilibre lors de l'association de particules virales à une surface présentant des glycanes est de l'ordre de ~1h (168,172).
- Le taux d'association initiale (initial binding rate) apparaît comme le paramètre analytique le plus pertinent à évaluer pour l'analyse de l'association de particules virales à la surface d'un biocapteur (168).

Les analyses quantitatives avec des capteurs surfaciques requièrent une calibration qui prend en compte le **transport des particules virales à la surface du biocapteur**. Les biocapteurs digitaux en cours de développement pourraient en théorie offrir une conversion directe entre la concentration volumique de biomolécules en solution et le nombre d'événements uniques d'association visualisées en fonction du temps, en plus d'offrir une sensibilité améliorée (186). Dans le cas de biocapteurs « analogiques » (SPR, interférométrie), le point bloquant majeur est **la conversion du signal SPR obtenu en nombre de particules virales**. Il est cependant possible de réaliser une calibration parallèle à partir d'échantillons de référence (purifiés et d'activité définie) à l'aide de capteurs permettant l'analyse de particules totales afin d'établir une corrélation entre la réponse SPR et le nombre de particules totales actives. Il est pour cela important de se placer dans des **conditions d'analyses où la réponse est directement proportionnelle à la densité surfacique de virus associé en surface du biocapteur**.

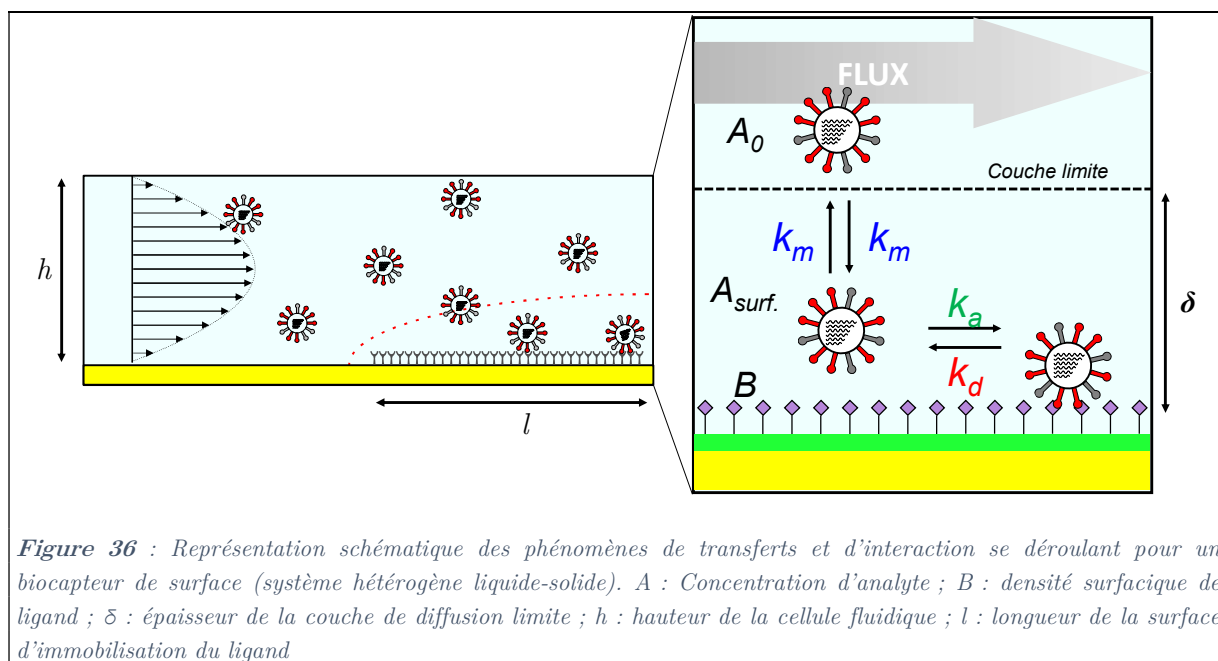
III.5. Application de la SPR à l'analyse quantitative

III.5.1. Modèle d'interaction avec limitation par le transfert de masse

La SPR permet de caractériser les interactions biomoléculaires se déroulant dans l'environnement proche d'une surface sur laquelle le ligand est immobilisé (longueur de pénétration plasmonique $L_z \sim 100 - 300nm$). Elle permet donc d'évaluer des interactions biomoléculaires s'opérant en phase hétérogène liquide-solide entre le ligand immobilisé et l'analyte transporté jusqu'à la surface du biocapteur. Le signal SPR résulte donc de la combinaison des phénomènes de transport de l'analyte jusqu'à la surface du capteur, ceci incluant le transport convectif et la diffusion de l'analyte, et d'association/dissociation du couple analyte-ligand (194). Le modèle bi-compartimental est souvent utilisé pour décrire les phénomènes de transport et d'association/dissociation qui ont lieux en surface des biocapteurs SPR lorsque le transport de l'analyte est pris en compte (195,196). Ce modèle est représenté dans la **Figure 36** et correspond à :



A_0 désigne ici la concentration de l'analyte en solution dans notre échantillon, c'est-à-dire la concentration que l'on cherche à évaluer. Dans le cas où la diffusion de l'analyte à la surface est plus lente que son association au ligand, les concentrations d'analyte en solution et à la surface du biocapteur diffèrent ($A_0 \neq A_{surface}$). Le mécanisme d'interaction de l'analyte avec le ligand est modélisé par k_a [$M^{-1}.s^{-1}$] et k_d [s^{-1}] qui désignent respectivement les constantes des taux d'association et dissociation de l'analyte, tandis que le phénomène de transport est modélisé par le coefficient de transfert de masse k_m [$m.s^{-1}$].



On parle de limitation par le transfert de masse (aussi appelée *MTL*) lorsque les constantes de taux d'association et de dissociation apparentes² (appelées k_{on} et k_{off}) vont différer des constantes intrinsèques. Dans le cadre de l'application « classique » de la SPR pour la détermination des k_a et k_d , cette limitation est logiquement indésirable. Le modèle bi-compartimental conduit à l'équation :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \frac{k_a A_0 (B_0 - \Gamma(t)) - k_d \Gamma(t)}{1 + \frac{k_a (B_0 - \Gamma(t))}{k_m}} \quad [\text{équation 3.2}]$$

² Ici, les « constantes apparentes » diffèrent des constantes apparentes obtenues par effet d'avidité (partie III.4.1.2) qui vont influencer uniquement l'association/dissociation (k_a , k_d).

Où Γ correspond à la densité surfacique d'analyte associé au ligand, $d\Gamma/dt$ au taux d'association, A_0 la concentration d'analyte et B_0 la densité surfacique de ligand libre. On observe qu'il y a un terme de résistance par le transfert de masse (ou MTL) qui apparait au dénominateur et qui se retrouve dans les constantes de taux d'association/dissociation apparentes :

$$k_{on} = \frac{k_a}{1 + \frac{k_a(B_0 - \Gamma(t))}{k_m}} \quad k_{off} = \frac{k_d}{1 + \frac{k_a(B_0 - \Gamma(t))}{k_m}} \quad \text{avec} \quad MTL = \frac{1}{1 + \frac{k_m}{k_a(B_0 - \Gamma(t))}}$$

On peut cependant trouver des simplifications de cette équation selon si la réaction est dominée par les phénomènes d'association-dissociation (cas d'une *diffusion rapide* de l'analyte) ou bien de transfert par convection-diffusion (cas d'une *diffusion lente*), détaillées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Simplifications du modèle de réaction-diffusion surfacique et équations correspondantes. Q : débit.

CONDITIONS	Simplification	Conditions expérimentales	Equations correspondantes
Diffusion rapide	$k_m \gg k_a(B_0 - \Gamma(t))$	• $Q \uparrow$ • $B_0 \downarrow$	$k_{on} \sim k_a \quad k_{off} \sim k_d$ $\frac{d\Gamma}{dt} = k_a A_0 (B_0 - \Gamma) - k_d \Gamma$ [3.3]
Diffusion lente (MTL)	$k_m \ll k_a(B_0 - \Gamma(t))$	• $Q \downarrow$ • $B_0 \uparrow$	$k_{on} \sim \frac{k_m}{(B_0 - \Gamma)} \quad k_{off} \sim \frac{k_m k_d}{k_a(B_0 - \Gamma)}$ $\frac{d\Gamma}{dt} = k_m A_0 - \frac{k_m k_d \Gamma}{k_a(B_0 - \Gamma)}$ [3.4]

En conditions de limitation par le transfert de masse ($k_a B_0 \gg k_m$), on observe que si l'on se place en conditions initiales où la surface est encore vierge de complexes analyte-ligand ($\Gamma_{t \sim 0} = 0$), on obtient l'équation suivante :

$$\left. \frac{d\Gamma}{dt} \right|_{t \sim 0} = k_m A_0 \text{ [équation 3.5]}$$

En condition de limitation « totale » par le transfert de masse, on a donc une relation linéaire entre la concentration d'analyte en solution et le *taux d'association initiale*. Il est alors intéressant de se placer dans ces conditions pour évaluer les concentrations de biomolécules en solution car la réponse obtenue est en théorie indépendante de l'affinité de l'analyte pour le ligand (195,197,198). A noter qu'il faut cependant avoir une affinité suffisamment forte entre

l'analyte et le ligand pour valider la condition $k_a B_0 \gg k_m$. Il apparait aussi qu'il faut fonctionnaliser la surface avec une densité de ligand faible dans le cas d'analyses cinétiques, et élevée dans le cas d'analyses quantitatives. D'un point de vue expérimental, la réalisation d'analyses SPR quantitatives en « conditions initiales » ne requiert pas d'atteindre l'équilibre et nécessite des temps d'interactions relativement courts (~1 min, et donc volume d'échantillon potentiellement plus faible que pour celui nécessaire à l'obtention d'un état d'équilibre).

III.5.2. Application du modèle à l'analyse SPR quantitative

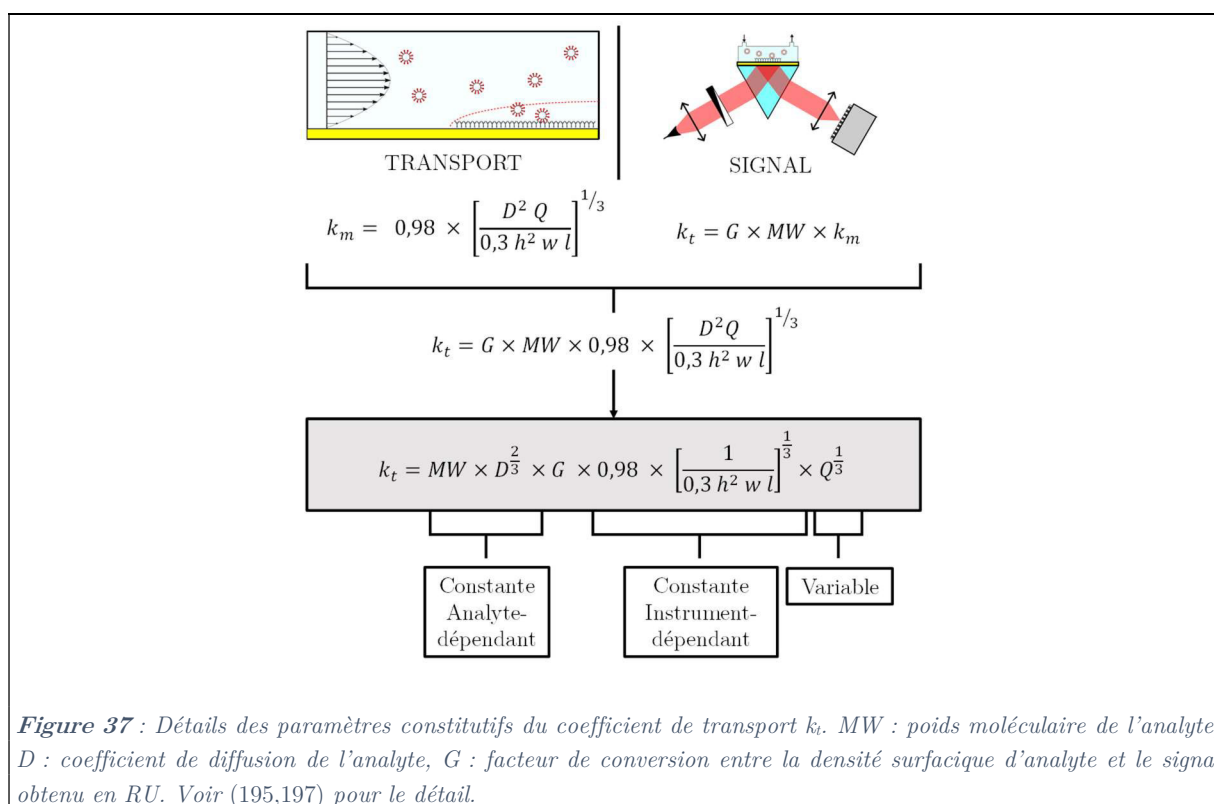
La simplification du modèle MTL (équation 3.5) est intéressante car elle permet d'évaluer *directement* une concentration d'analyte sur la base du taux d'association. Le flux d'un analyte à travers une couche de diffusion limite à la surface d'un capteur, ou flux diffusif (J_D) peut être modélisé par l'équation de diffusion (ou loi de Fick) : $J_D = D \frac{\partial C_A}{\partial z} \approx \frac{D(A_0 - A_{surf.})}{\delta} l w$ [équation 3.6]. On voit que J_D dépend de paramètres géométriques de la surface fonctionnalisée, du gradient de concentration de l'analyte à travers la couche de diffusion limite δ , et de paramètres biophysiques de l'analyte qui vont influencer la valeur du coefficient de diffusion D . La résolution analytique de l'équation de diffusion pour la configuration géométrique des capteurs SPR permet d'obtenir une valeur de k_m qui dépend uniquement de ces paramètres géométriques, du coefficient de diffusion de l'analyte D et du débit Q ³. En couplant l'équation 3.5 avec les facteurs de conversion évalués entre la densité surfacique d'analyte et le signal obtenu en RU, il est possible de définir un nouveau coefficient de transport k_t qui permet une évaluation directe des concentrations en analyte sur la base du taux de réponse initial (voir **Figure 37**) :

$$\left. \frac{dR}{dt} \right|_{t \sim 0} = k_t A_0 \text{ [équation 3.7]}$$

La société Biacore a évalué et breveté une méthodologie (CFCA) permettant l'évaluation des concentrations actives d'un analyte uniquement sur la base de constantes qui dépendent de paramètres biophysiques de l'analyte et géométriques de l'instrument, par variation du débit en conditions MTL (voir **Figure 37**). Cette méthodologie est particulièrement intéressante pour le développement de dosages d'activité de biomolécules (vaccins, anticorps monoclonaux,

³ Puisque k_m correspond au flux diffusif moyen (à travers l'ensemble de la surface active) sur la concentration : $k_m = J_D/A_0$ (262).

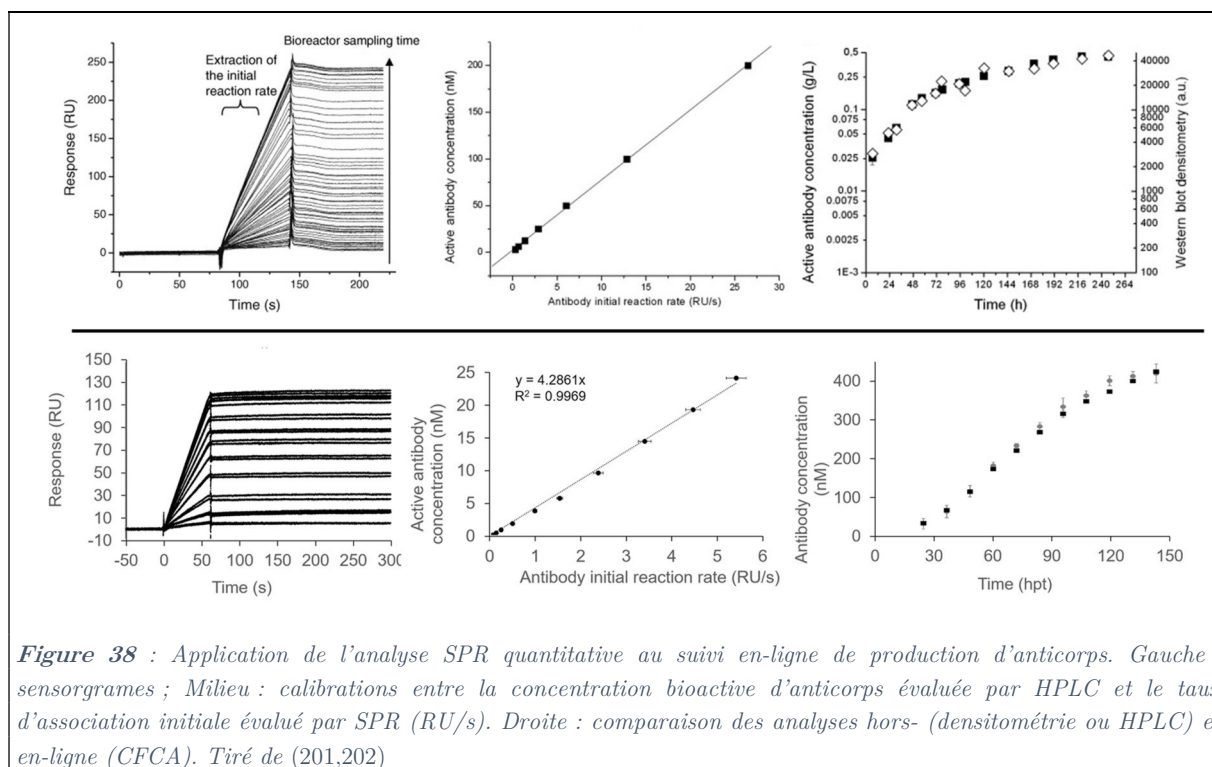
protéines,..) car elle offre une bonne précision ($\sim 8\%$) et ne nécessite pas l'emploi de standards de concentration connue (195,197,199).



III.5.3. Applications de la SPR quantitative au suivi de bioprocédés et au dosage d'activité vaccinale

Concernant l'application de la SPR quantitative au suivi *in-process* de bioprocédé, on peut souligner les travaux princeps de Jacquemart, Chavane et al. (200,201). Ces derniers ont démontré l'applicabilité de la SPR au suivi en-ligne de production de protéine et d'anticorps recombinants (voir **Figure 38**). Ils ont en effet obtenu de très bonnes corrélations entre la concentration **active** obtenue par analyse du taux d'association initiale et celle obtenue par densitométrie Western-Blot. Récemment, le même groupe a validé l'applicabilité de la méthodologie CFCA au suivi en ligne de production d'anticorps par culture cellulaire (**Figure 38**) (202).

En dehors de l'analyse en ligne, la SPR quantitative a été utilisée pour différentes applications, telles que le contrôle qualité des productions de biothérapies ou des réactifs de nature protéique, la validation d'analyses cinétiques, les dosages d'activité, l'évaluation de procédés de purification ou la réalisation d'études de stabilité... Ces applications sont détaillées par Karlsson (195).



Concernant l'application de la SPR quantitative au dosage d'activité vaccinale, Westdijk et al. ont évalué l'applicabilité de la SPR quantitative en remplacement de l'ELISA (méthode de référence présentant une forte variabilité inter-laboratoire et selon les anticorps utilisés) pour le dosage d'activité de vaccin Polio inactivé (203). Les auteurs ont démontré que la SPR quantitative était une méthode robuste, car le résultat était indépendant de l'anticorps utilisé, et qui offrait une bonne corrélation avec la quantité de particules virales. Ils ont conclu qu'elle était particulièrement indiquée comme dosage d'activité alternatif.

Les preuves de concepts réalisées pour de nombreuses utilisations, la diffusion de cette méthodologie et la simplification de sa prise en main font espérer que les autorités régulatrices accorderont un intérêt croissant à la SPR quantitative dans les années à venir afin de répondre aux exigences grandissantes concernant l'évaluation et le contrôle qualité des productions vaccinales et des biothérapies.

IV.

OBJECTIFS

PROBLEMATIQUES ET LIMITATIONS

Le procédé de production de vaccin influenza basé sur la culture en œuf embryonné présente plusieurs limitations, notamment lors de la production de vaccin ciblant des souches pandémiques. L'essor de procédés de production vaccinaux alternatifs à l'ovoculture et basés sur la culture cellulaire nécessite le développement de nouvelles techniques analytiques (**Chapitre I**), dans le but de pouvoir évaluer l'activité vaccinale et la productivité au long du procédé.

Les limitations des différentes méthodes analytiques alternatives développées à l'heure actuelle ont été abordées dans le **chapitre II** de cette thèse.

Dans le cas du virus influenza, il existe une variabilité et une dérive antigénique importantes. Cela rend le développement de dosages immunologiques d'activité complexes. La production des réactifs immunologiques (sérum ou anticorps) reste un point de blocage potentiel pour le développement et la validation de procédés, particulièrement dans le cas de souches pandémiques émergentes. C'est le cas à l'heure actuelle pour la SRID, la technique de référence pour la formulation des lots vaccinaux.

Par ailleurs, les dosages d'activité des productions vaccinales ne sont pas pour le moment réalisés sur les particules virales, mais uniquement sur les antigènes vaccinaux obtenus après purification et fragmentation. Des techniques analytiques émergentes permettent à présent de quantifier les particules virales « totales » majoritaire en comparaison des virus infectieux évalués par les dosages d'infectivité classiques. Ces techniques ne permettent cependant pas de quantifier spécifiquement les particules virales actives. En parallèle, le développement de biopuces et biocapteurs dédiés à l'analyse de HA et de particules virales a permis d'éclairer les relations structure-activité des particules virales d'influenza, et en particulier le mécanisme d'association des virus à des surfaces présentant des glycanes. Les caractéristiques physicochimiques (taille, valence/avidité) des antigènes vaccinaux influencent la réponse obtenue lors d'analyses réalisées avec des biocapteurs basés sur des surfaces fonctionnalisées (voir **chapitre III**).

Enfin, sur le plan du bioprocédé et de l'application de la stratégie PAT dans le cadre de l'évaluation des procédés vaccinaux : aucun biocapteur permettant un suivi de procédé en temps

réel et *in-process* n'a été développé à ce jour d'après la littérature scientifique. L'analyse *en-ligne* par un biocapteur impose la réalisation de prélèvements stériles, le pré-traitement et l'acheminement automatisé de l'échantillon jusqu'à la surface du capteur. Cette technologie, dite *at-line*, permettrait un suivi et un contrôle des procédés actuellement inenvisageables.

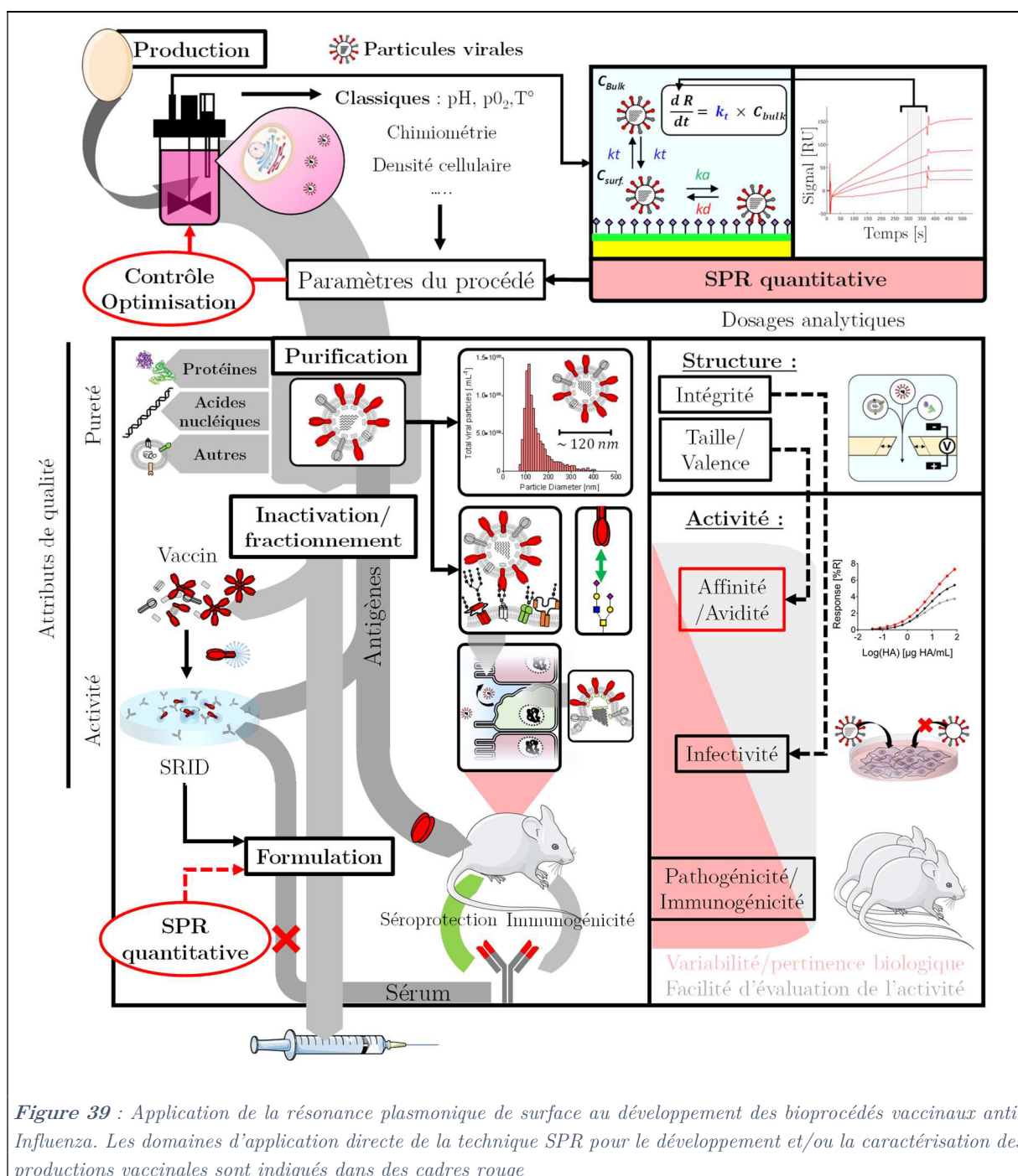


Figure 39 : Application de la résonance plasmonique de surface au développement des bioprocédés vaccinaux anti-Influenza. Les domaines d'application directe de la technique SPR pour le développement et/ou la caractérisation des productions vaccinales sont indiqués dans des cadres rouge

OBJECTIFS ET ETAPES DU PROJET DE THESE

La **Figure 39** est une vue d'ensemble du projet de recherche de cette thèse et détaille les applications potentielles de la SPR au développement des bioprocédés vaccinaux Influenza. Cette thèse s'est basée sur le développement et/ou l'utilisation de nouveaux outils analytiques permettant l'évaluation de paramètres cinétiques/biophysiques et la quantification d'antigènes vaccinaux issus de procédés de production de vaccin influenza. L'objectif principal était le *développement d'une nouvelle technique bioanalytique basée sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface pour la quantification en-ligne de particules virales d'Influenza*.

Afin de pouvoir développer et évaluer la méthode analytique, il a été nécessaire de produire et caractériser différents types de matériels de référence par différents dosages analytiques (voir **Figure 40** et **Chapitre V**).

Le **Chapitre VI** de cette thèse correspond au développement et à l'évaluation d'un test analytique quantitatif SPR pour l'analyse d'antigènes et de particules virales d'influenza, présenté sous la forme d'un article publié dans la revue **Vaccine**. Nous avons réalisé des corrélations entre la réponse SPR et les analyses réalisées avec d'autres méthodes de référence (dosages d'infectivité, dosages en particules totales) afin d'établir quel(s) attribut(s) de la particule virale guidait la réponse lors d'analyses SPR.

Le **Chapitre VII** détaille les résultats obtenus lors du développement de tests multiplexés pour l'analyse d'antigènes vaccinaux et de contaminants issus de cultures cellulaires. Les objectifs étaient ici : 1/ de développer un modèle permettant d'évaluer en détail l'impact de différents paramètres (densité surfacique de ligand, type de liaison terminale...) sur la réponse SPR ; 2/ de développer un test SPR multiplexé pour l'analyse quantitative de contaminants de type « vésicules extracellulaires ».

Le **Chapitre VIII** est présenté sous la forme d'un manuscrit que nous allons soumettre à la revue **Biotechnology and Bioengineering**. Afin de pouvoir procéder à des analyses en ligne avec le test simplex développé, une ligne de prélèvement et de purification a été mise en place.

Le test analytique a ici été évalué sur des productions virales réalisées sur une lignée cellulaire aviaire en suspension et la lignée MDCK. Nous avons cherché à évaluer l'impact de différents paramètres (plateformes cellulaires d'expression, degré de pureté, taille) sur la réponse SPR afin de caractériser la robustesse de cette technique. Enfin nous avons couplé la ligne de prélèvement automatisée avec l'appareil SPR afin de réaliser un suivi en-ligne des productions virales issues de cultures cellulaires en suspension, avec comme but final de fournir un nouvel outil analytique permettant l'évaluation de l'activité vaccinale au cours du procédé de production.

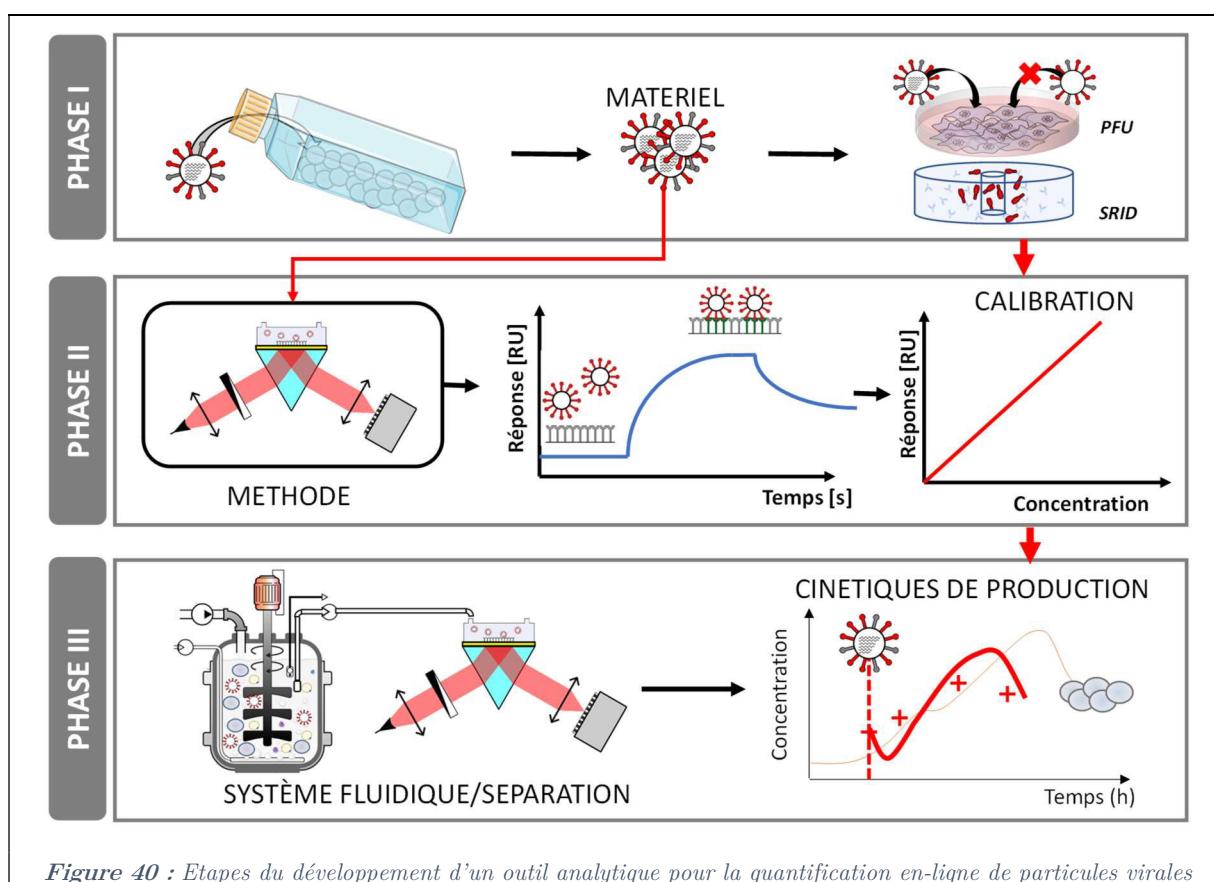


Figure 40 : Etapes du développement d'un outil analytique pour la quantification en-ligne de particules virales

V.

MATERIELS & METHODES

V.1. Tables des produits et matériel utilisés

Tableau 14 : Table des matières premières et réactifs utilisés

Dénomination	Détail	Fournisseur	Ref. fournisseur	CAS
Ethanol absolu	Ethanol absolu anhydre RPE	Carlo Erba	4146012	64-17-5
Streptavidine (<i>Streptomyces avidinii</i>)	Purifiée par affinité, lyophilisée (tampon phosphate de potassium 10 mM), activité : ≥13 U/mg	Sigma	85878	9013-20-1
Neuraminidase bactérienne issue de <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Applicable au développement de kits et réactifs de diagnostic, Type V, poudre lyophilisée	Sigma	N-2876	9001-67-6
Trypsine	Trypsine acétylée issue de pancréas bovin	Sigma	T-6763	EC Number : 3.4.21.4
Protéine A recombinante	RPA-100 Ultrapure rProtein A	Repligen	RPA-100	X
Acide α-lipoïque	Pureté ≥ 98,0%	Sigma	62320	1077-28-7
N-Hydroxysuccinimide	Pureté 98%	Sigma	130672	6066-82-6
N-(3-Dimethylaminopropyl)- N'-ethylcarbodiimide hydrochloride	Poudre, grade commercial	Sigma	E7750	25952-53-8
Triton-X100	Polyethylene glycol tert- octylphenyl ether	Merck	X100	9002-93-1
Brij-97	Polyoxyethylene 10 oleoyl ether	Sigma	P-6136	9004-98-2
Polysorbate 20 (TWEEN- 20)	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate	Sigma	P 1379	9005-64-5
Albumine de sérum bovin (BSA)	Pureté ≥ 98,0% (agarose gel electrophoresis), poudre lyophilisée	Sigma	A 3733	9048-46-8
Fétuine bovine	Fétuine de type IV, poudre lyophilisée, >5% (poids/poids) NANA	Sigma	F-3004	9014-81-7
Fétuine-agarose	Suspension à 0,5 M NaCl (0,02% thimerosal)	Sigma	F 3256	X
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	500 tests	ThermoFischer	23225	X

Tableau 15 : Liste des milieux de culture utilisés pour la production virale et le titrage infectieux des particules virales

Réactif	Composition	Référence
Milieu de culture cellulaire MDCK	Milieu Ultra-MDCK complémenté avec : 2mM finaux de L-glutamine 100 U/ml finaux de pénicilline/streptomycine	Ultra-MDCK (Lonza, réf 12-749Q) L-Glutamine (Lonza, réf BE17-605E) Pénicilline/streptomycine (Lonza, réf DE17-602E)
Milieu de production virale MDCK	Milieu EMEM complémenté avec : 2mM finaux de L-glutamine 100 U/ml finaux de pénicilline/streptomycine 1 µg/ml final de trypsine	EMEM (Lonza, réf BE12- 125F) L-Glutamine (Lonza, réf BE17-605E) Pénicilline/streptomycine (Lonza, réf DE17-602E) Trypsine (Sigma, réf T6763-100MG)
Milieu de culture cellulaire/Production virale T-17	Milieu Optipro complémenté avec : 2mM finaux de L-glutamine 100 U/ml finaux de pénicilline/streptomycine 0,5 µg/ml final de trypsine 0,2% final de poloxamer	Optipro SFM (Lonza, 102750) L-Glutamine (Lonza, réf BE17-605E) Pénicilline/streptomycine (Lonza, réf DE17-602E) Trypsine (Sigma, réf T6763-100MG) Pluronic F-68 (Sigma, P1300)
Milieu semi-solide (dosages d'infectivité)	Mélange 1 :1 d'Agar Noble fondu et de milieu MEM 2X complémenté avec : 200 U/ml finaux de pénicilline/streptomycine 2 µg/ml final de trypsine	MEM 2X (Gibco, réf 21935) Pénicilline/streptomycine (Lonza, réf DE17-602E) Trypsine (Sigma, réf T6763-100MG) Agar Noble (BD-Difco, réf 214220) dilué à 1,1% m/v dans l'eau milliQ

Tableau 16 : Liste du matériel utilisé pour le dosage d'activité hémagglutinante

Matériel	Spécifications	Référence
Sang frais	Sang de poule ou de cobaye (Conservation à 4°C pendant 1-2 semaines)	Charles River :Réf 30_21000072_10 ml/ 20_21000072_10 ml
Tampon Salk	20x : 85 g NaCl, 9,8 g KH ₂ PO ₄ , 1,5 g NaOH dans 500 ml H ₂ O pure, puis stérilisation par autoclavage (10 min à 110°C)	X
Plaque 96	Plaque 96 puits à fond conique	Greiner bio-one, Réf 651101

Tableau 17 : Glycanes utilisés pour le développement d'un test d'analyse multiplexé. Les composés multivalent biotinylés sont décrits comme possédant un degré de pureté >95%, avec une précision de 10% sur la quantité massique des composés obtenue après lyophilisation (204).

Référence CFG	Structure	Nom	Groupeement espaceur (Sp)	C _{stock} [mg.mL ⁻¹]
Tr 33	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb-Sp	3'SLN	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Tr 36	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb-Sp	6'SLN	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Te 98	(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-Sp	LNLN	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Te 74	Neu5Aca2-3(GalNAcb1-4)Galb1-4Glc-Sp	GM2	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Te75	Neu5Aca2-3(Galb1-3GalNAcb1-4)Galb1-4Glc-Sp	GM1	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Te 175	Neu5Aca2-3[Galb1-4GlcNAcb1-3]2b-Sp	3'SLNLN	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
Te 176	Neu5Aca2-6[Galb1-4GlcNAcb1-3]2b-Sp	6'SLNLN	-CH ₂ CH ₂ N ₃	2
PA 248	Neu5Aca2-3(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-SpNH-PAA-30kD	3'SLNLN-PAA	PAA-CH ₂ CH ₂ N ₃	0,1
PA 199	Neu5Aca2-6(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-SpNH-PAA-30kD	6'SLNLN-PAA	PAA-CH ₂ CH ₂ N ₃	0,5
PA 362	Neu5Aca2-3(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-SpNH-PAA-30kD	3'SLNLN-PAA-Biot	PAA-Biotine	0,5
PA 343	Neu5Aca2-6(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-SpNH-PAA-30kD	6'SLNLN-PAA-Biot	PAA-Biotine	0,5
PA 368	(Galb1-4GlcNAcb1-3)2b-SpNH-PAA-30kD	LNLN-PAA-Biot	PAA-Biotine	0,5
01-000	HOCH ₂ (HOCH) ₄ CH ₂ NH-PAA-biotin	PAA-Biot	PAA-Biotine	1
01-088	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAca-PAA-biotin	3'SLG-PAA-Biot	PAA-Biotine	1

Tableau 18 : Anticorps anti-tétraspanines utilisés pour le développement d'un test d'analyse multiplexé

Anticorps	Référence	Informations	Epitope	C _{stock} [µg.mL ⁻¹]
Anti-CD9	ABIN388289	Polyclonal, lapin anti-humain	AA 115-145	1300
Anti-CD63	ABIN651526	Polyclonal, lapin anti-humain	AA 163-190	500
Anti-CD81	ABIN1871343	Polyclonal, lapin anti-humain	AA 113-201	770

Tableau 19 : Protéines recombinantes (tétraspanines) utilisées pour le développement d'un test d'analyse multiplexé

Protéine	Référence	Info	Fournisseur	C _{stock} [µg.mL ⁻¹]
CD9 (humain)	CD9-H5220	CD9 humain, His-Tag (P21926-1) exprimé en système HEK293. Contient la séquence Ser 112 - Ile 195	Acro Biosystems	100
CD63 (humain)	11271-H8H	CD63 humain, His-Tag (P08962-1) exprimé en système HEK293. Contient la séquence Ala 103-Val 203	Sino Biologicals	250
CD81 (humain)	14244-HNCH	CD81 humain (NP_004347.1) (Phe 113-Lys 201) exprimé en système HEK293 avec deux acides aminés additionnels en N-term (Gly&Pro)	Sino Biologicals	250

Tableau 20 : Protéines recombinantes utilisées pour le développement d'un test d'analyse multiplexée

Protéine	Référence	Système d'expression	Fournisseur
HA recombinante (A/California/04/2009)	11085-V08H	HEK293	Sino Biologicals
M1 recombinante (A/Puerto Rico/8/1934)	QP-1429-100µg	HEK293	Enquire Bio
NA recombinante (A/California/04/2009)	11058-V01H	HEK293	Sino Biologicals

Tableau 21 : Composantes du système mis en place pour le suivi en-ligne de productions virales

Composant	Référence	Quant.	Documentation
Microcontrôleur	Arduino Uno rev3	1	https://www.arduino.cc/
Valve solénoïde 3 voies	SMC LVM105R-5C1U	1	https://www.smc pneumatics.com/
Détecteur air/liquide	Introtek AD9	1	http://introtek.com/
Flacon de culture	Bellco, 500 mL spinner Flask	1	https://bellcoglass.com/
Clarificateur	Applikon Biosep 10L	1	https://www.applikon-biotechnology.com/nl/products/biosep/
Tuyau	Pharmed®/Tygon®	3 m	https://www.biopharm.saint-gobain.com/
Connecteurs fluidiques	Nombreuses	X	https://www.nordsonmedical.com/ https://www.eoxshop.com/
Pompe péristaltique	GE Healthcare P-1	2	https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/chromatography/tools-and-accessories/pumps/peristaltic-pump-p-1-p-00564#overview

V.2. Production de matériel viral de référence

Différentes plateformes production de virus Influenza ont été employées durant cette thèse, à savoir l'ovoculture et la culture cellulaire sur cellules adhérentes et en suspension.

V.2.1. Procédés de production virale

- **Production de lot de virus fragmenté par ovoculture**

Un lot de virus H1N1 (souche A/H1N1/reassortant/NYMCX-179) inactivé par fragmentation a été réalisé au laboratoire sur la base d'une production virale par ovoculture. Les productions virales ont été réalisées en œuf embryonné à 11 jours d'embryogénèse. Les œufs ont été mirés, infectés par injection dans la cavité allantoïque et placés à l'incubateur (37°C, 5% CO₂). Le fluide allantoïque a été récolté 72 h après infection avant concentration des virus/purification par ultracentrifugation sur coussin de saccharose (20% v/v, 31000 rpm - 2h). Les culots obtenus ont été dilués dans du tampon PBS, regroupés et déposés sur un gradient continu de saccharose (25-60%, 31 000 rpm - 12h). La bande de virus visible a été collectée avant une purification finale par ultracentrifugation en tampon PBS (31000 rpm - 2h). Le culot obtenu a été resuspendu en tampon PBS avant fragmentation par ajout de détergent (Triton-X100, 0,5% v/v, 1 h, 37 °C) et dialyse en tampon PBS (2h, 4°C, cassette 10 kDa MWCO, Thermo Scientific). Le détergent a par la suite été capturé par ajout d'une résine de polystyrène absorbante (Bio-beads SM2, Bio-rad, 14,3 g/g Triton X-100, 40 mins). Après élimination des billes de résine, l'échantillon a été inactivé par ajout de formaldéhyde (0,01% v/v, 72h, 20 °C).

- **Cellules adhérentes *Madin–Darby canine kidney* (MDCK)**

Des productions de virus ont été réalisées par infection de culture de cellules MDCK (MDCK, ATCC CCL34). Les cellules MDCK sont des cellules épithéliales adhérentes, issues d'épithélium rénal de chien. Elles sont largement utilisées pour la production de virus influenza soit en culture adhérente en flasque de culture soit sur microporteurs (22). Les cellules ont été cultivées en milieu sans sérum ultra-MDCK, ensemencées à 1-2.10⁴ cellules/cm² en flasques pour culture de cellules adhérentes (T-175 cm²). Des passages cellulaires ont été réalisés tous les 2-3 jours par trypsination des cellules, centrifugation et réensemencement dans du milieu frais (205). Les infections ont été réalisées à 70–80% de confluence (correspondant à approximativement 10⁵

cellules/cm²) par ajout de virus pré-dilué dans du milieu d'infection afin d'obtenir une multiplicité d'infection de 10^{-3} DICT₅₀/cellule. La multiplicité d'infection est le ratio entre le nombre de particules virales infectieuses et la concentration cellulaire au moment de l'infection (ou *Multiplicity of Infection* – MOI). De la trypsine (trypsine acétylée issue de pancréas bovin) a été ajoutée à la concentration de 1 µg/mL lors de l'infection. En parallèle, des cultures *mock* (non infectées) de cellules MDCK ont été réalisées dans le but de produire des vésicules extracellulaires à partir des surnageants de culture, récoltés lors du passage de ces cultures de cellules MDCK.

- **Cellules en suspension Duckcell-T17®**

La lignée cellulaire DuckCelt®-T17 est une lignée cellulaire aviaire adaptée en suspension développée par la société Transgène et évaluée au sein du laboratoire Virpath (voir publication en **Annexe** (32)). Les cellules ont été cultivées en flasques agitées de volume variable (200-1000 mL) en incubateur (ISF1-X, Khüner, 120 rpm, 37°C, 5% CO₂) etensemencées à la concentration de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Des passages ont été réalisés tous les 2-3 jours par dilution d'un inoculum de suspension cellulaire dans un volume de milieu neuf. L'inoculum est défini d'après la numération visuelle des cellules viables sur cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan. Les infections de cultures T-17 ont été réalisées à environ $1 \cdot 10^6$ cell/mL avec une multiplicité d'infection de 10^{-3} DICT₅₀/cellule et ajout de trypsine à une concentration de 0,5 µg/mL. Du poloxamer (pluronic F-68, Sigma, P1300) a été ajouté à 0,2% (v/v) dans les cultures en suspension T-17.

V.2.2. Souches virales

Le **Tableau 22** présente les différentes souches virales utilisées. Des souches de sous-type H1N1 et H3N2 ont été utilisées à partir de la virothèque du laboratoire Virpath⁴. Les critères de choix étaient :

- La productivité des souches virales vis-à-vis de la plateforme d'expression choisie
- L'utilisation présente/passée de ces souches comme souches vaccinales

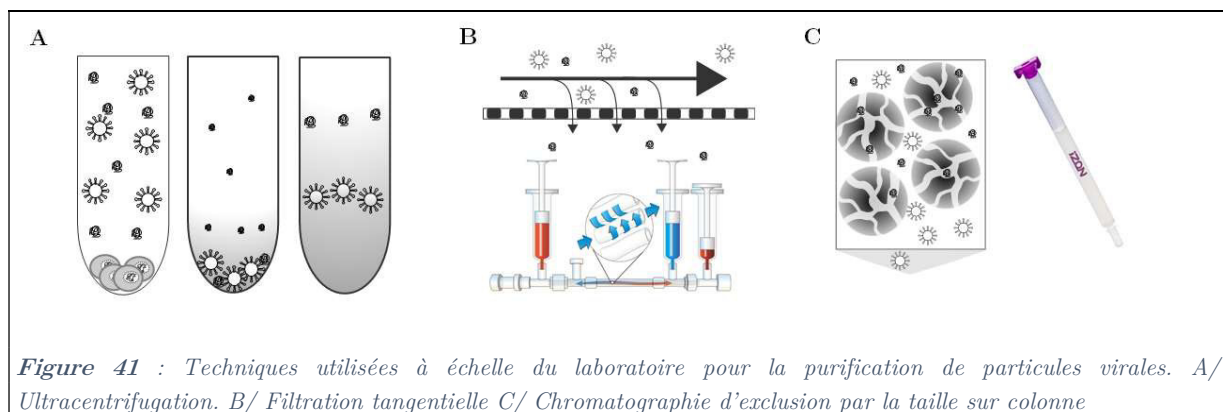
⁴ Laboratoire Virpath, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon

Tableau 22 : Souches virales utilisées durant le projet de thèse. *Souche réassortante entre A/H1N1/California/07/2009 et A/Puerto Rico/8/1934. Source : <https://www.fludb.org>

Sous-type	Souche	Composition vaccinale (année)
H1N1	A/H1N1/California/07/2009	2010-2014
	A/H1N1/reassortant/NYMCX-179*	2010-2014*
	A/Puerto Rico/8/1934	Ancienne souche vaccinale. Souche «de laboratoire »
H3N2	A/Texas/50/2012	2013-2015
	A/Panama/2007/99	2001-2004

V.3. Purification de matériel issu de culture cellulaire

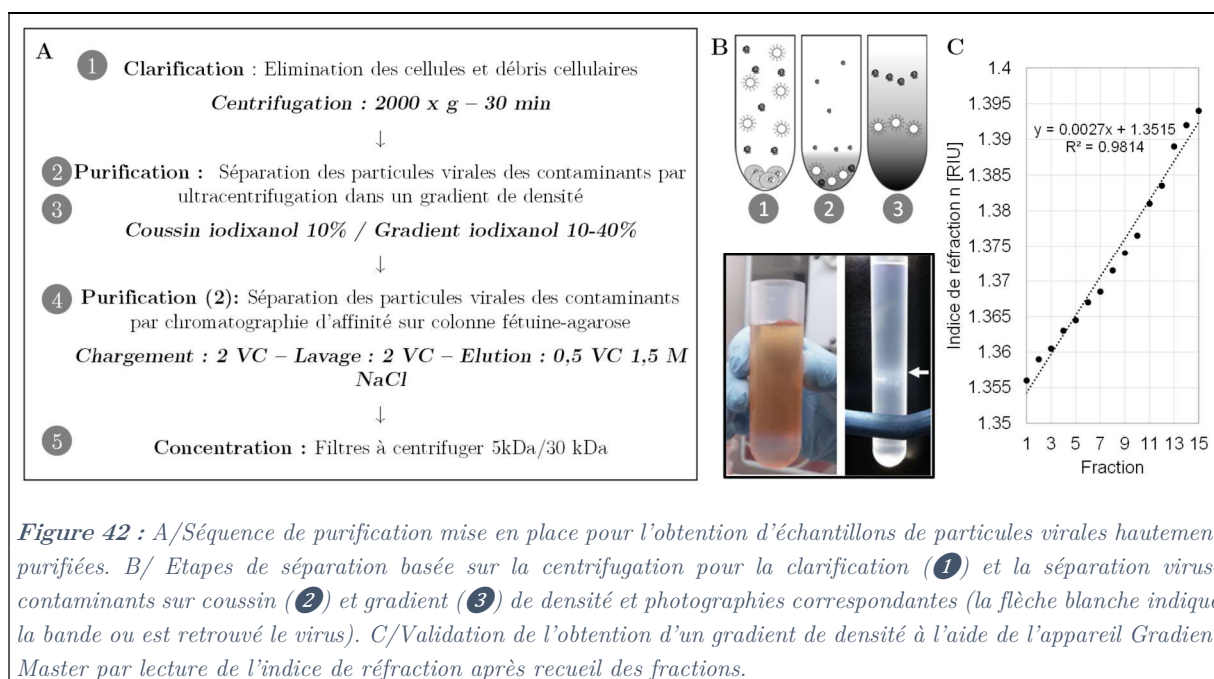
Différentes méthodes de purification ont été utilisées ou développées au cours de la thèse (voir **Figure 41**).



Ces méthodes sont classiquement utilisées pour la purification de productions de particules virales à l'échelle du laboratoire (voir la revue sur les bioprocédés de production de VLPs Influenza en Annexe). Elles ont été utilisées pour la purification de particules virales ou de vésicules extracellulaires issues de surnageant de culture MDCK.

• Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une méthode de référence pour la purification de particules virales à échelle du laboratoire (206). Une purification par centrifugation séquentielle des surnageants de culture de cellules MDCK clarifiés (2000xg – 30 min) a été réalisée (Modèle : Beckman Coulter Optima L-80 XP, Rotor : SW28/SW 32 ti). Les surnageants de culture clarifiés ont été déposés sur coussin d'Iodixanol (Optiprep®) avant ultracentrifugation (coussin de 4 mL à 10% v/v - 112 000xg – 90 min – 4°C). Le culot obtenu a été remis en suspension en tampon NTC (100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl) et déposé sur gradient d'Iodixanol (10-40% - 112 000xg – 12 h – 4°C). Pour la séparation par ultracentrifugation, des gradients de densité ont été réalisés à l'aide de solutions d'Iodixanol sur l'appareil Gradient master 108 (Biocomp; Conditions : tubes SW 32 Ti – Inclinaison : 80° - 20 rpm – 2 min). La conformité de ces gradients a été évaluée au préalable par lecture de l'indice de réfraction sur les différentes fractions à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe (voir **Figure 42C**).



• Chromatographie d'affinité

Un protocole de purification de virus influenza par chromatographie d'affinité préparative a été mis en place afin d'obtenir des échantillons de virus hautement purifiés et concentrés. Les échantillons issus des étapes de purification par ultracentrifugation ont été passés sur une colonne

de chromatographie préparative contenant 2,5 mL d'une phase stationnaire de fétuine-agarose selon le protocole détaillé dans la **Figure 42A**. La bande de virus (env. 2 mL) du gradient d'iodixanol (voir protocole ci-dessus) a été diluée au 1/5 dans du tampon NTC. Un volume de 5 mL (2 volumes colonne) de cet échantillon a ensuite été chargé sur la colonne après équilibration en tampon NTC. Un lavage a ensuite été réalisé avec 5 mL de tampon NTC et élution par 1,25 mL de tampon NTC additionné de NaCl à la concentration finale de 1,5 M. Les fractions d'intérêts collectées lors de la phase d'élution ont été assemblées et concentrées/diafiltrées par filtration membranaire (Amicon® Ultra-15, MWCO : 30 kDa) dans le but d'obtenir un échantillon de référence pour des analyses LC-MS-MS.

- **Filtration par exclusion stérique**

Une filtration par exclusion stérique (colonne qEV single, IZON science) a été réalisée sur des productions de vésicules extracellulaires issues de cellules MDCK concentrées et diafiltrées par ultracentrifugation et filtration membranaire (Facteur de concentration volumique = 450). Le protocole suivi pour la concentration et la purification de ce matériel de type « vésicules extracellulaires » issues de culture cellulaire MDCK est détaillé dans le **Tableau 23**.

Tableau 23 : Détails du protocole de purification de matériel de type vésicules extracellulaires issues de cellules MDCK. F_{conc} : facteur de concentration volumique (ratio volume initial d'échantillon/volume de rétentat).

Etape	Détails	F_{conc}
Clarification : Elimination des cellules et débris cellulaires	Centrifugation : 2000 x g – 30 min	1
Purification/concentration	Ultracentrifugation : 18 000 x g – 2h – resuspension en PBS	450
	Filtres à centrifuger Amicon® Ultra-15 (MWCO : 30 kDa) – Diafiltration PBS	1
Purification	Chromatographie d'exclusion stérique (qEV IZON)	1

Le matériel purifié et concentré obtenu a été aliquoté et congelé dans le but de servir de matériel de référence pour l'évaluation de test SPRI multiplexés dédiés à la détection de vésicules extracellulaires (voir **VII.6.3**). Une évaluation a été réalisée par TRPS (voir **V.7.5**) pour obtenir des données qualitatives et quantitatives sur ce matériel.

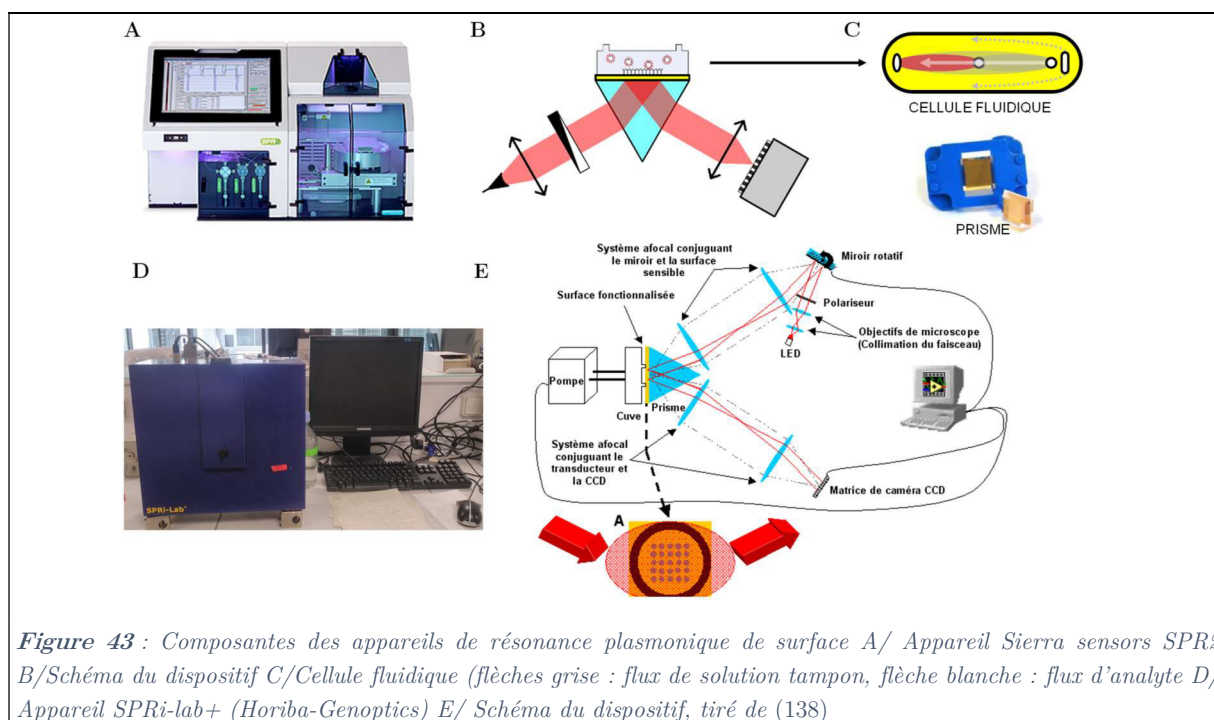
V.4. Biocapteurs d'imagerie par résonance plasmonique de surface

V.4.1. Appareils et calibration

Deux appareils d'imagerie SPR ont été utilisés au cours de la thèse (voir **Figure 43**) :

- L'appareil SPR-2 (Sierra Sensors, maintenant Brucker Daltonics)
- L'appareil SPRi-lab+ (Horiba-Genoptics)

Ces deux appareils sont des appareils d'imagerie SPR. Ils sont basés sur l'analyse des variations de réflectivité à angle fixe pour une zone d'intérêt prédéfinie. Le système SPR2 permet cependant l'interrogation de 2x2 zones alors que le système Horiba permet de définir plusieurs zones d'interrogation. Le système SPR-2 a été utilisé pour le développement d'un test SPR quantitatif automatisé dédié au suivi en ligne de productions virales (voir **Chapitre VI** et **Chapitre VIII**), tandis que le système SPRi-lab+ a été utilisé lors du développement de tests SPRi multiplexés (voir **Chapitre VII**).



Une calibration automatique du système est réalisée avant chaque analyse afin de fixer l'angle de travail. Cette calibration est faite sur la base de courbes de réflectivité obtenues pour les différentes zones d'intérêt en fonction de l'angle incidence du faisceau éclairant le prisme (voir **Figure 44**). L'angle de travail calculé correspond à la moyenne des positions du maximum de la dérivée première des courbes de réflectivité.

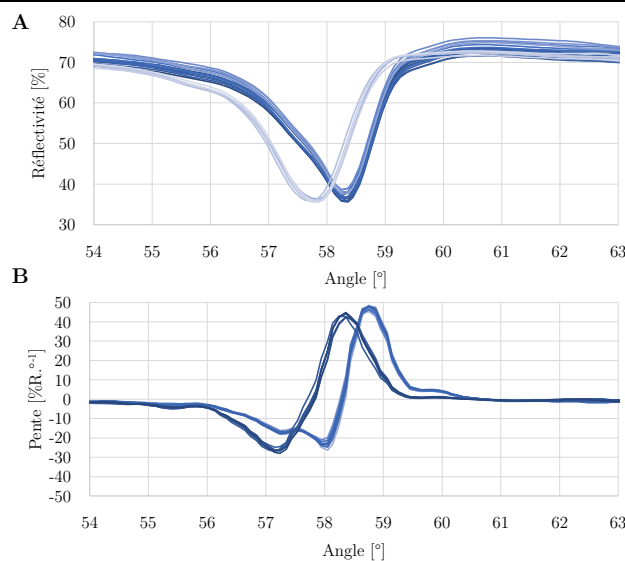


Figure 44 : A/Courbes de réflectivité en fonction de l'angle incident d'illumination du prisme, obtenues pour 20 zones d'intérêt sur le système SPRI-lab+ B/Dérivée première des courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence.

L'appareil SPRI-lab+ fournit une réponse en pourcentage de réflectivité (%R) à partir du niveau de gris évalué pour chaque pixel de la caméra. Pour cela, deux images différentes sont au préalable analysées à deux degrés de polarisation du faisceau incident (TM et TE, sur la base des images obtenues avant et après variation angulaire à 90° du polariseur linéaire du système optique) (138):

- Une image à intensité réfléchie nulle (LED éteinte)
- Une image prise lorsque les conditions de résonance ne sont pas remplies, c'est-à-dire en conditions de réflexion totale interne pour toute la plage angulaire d'incidence incluant l'angle de résonance plasmonique

La réflectivité est ensuite évaluée grâce à la relation suivante (issue de (138)):

$$R_{Prisme,TM}(t) = \frac{(Niv_{TM}(t) - Niv_0) R_{Prisme,TE}}{(Niv_{TE} - Niv_0)}$$

Avec : $Niv_{TM}(t)$ le niveau de gris d'un pixel à l'instant t , Niv_0 et Niv_{TE} les niveaux de gris correspondants aux conditions de réflectivité nulle et totale (évaluée en mode de polarisation TE) et $R_{Prisme,TE}$ la réflectivité théorique du prisme utilisé.

En pratiques, la réflectivité est évaluée lors de la réalisation des courbes de réflectivité à partir des images réalisées lorsque le miroir obture le faisceau incident (intensité nulle), puis lorsqu'il balaye les angles d'incidence, cela pour les deux modes de polarisation utilisés. Des zones d'intérêt

peuvent être par la suite définies par l'utilisateur afin que le système détermine la réponse moyenne obtenue sur les pixels délimités. Celles-ci vont correspondre aux plots de ligand fonctionnalisés en surface de la biopuce (voir **partie V.5.1**).

Une calibration du système a été réalisée pour les deux appareils par injection d'une solution d'indice de réfraction proche de la solution tampon circulante utilisée pour les analyses (solution de PBS-Tween 0,005% avec ajout de glycérol à 0,5% v/v). Cette légère variation d'indice du milieu couvrant Δn_c entraîne une variation du signal SPRi (ΔR [%]) linéairement proportionnelle à Δn_c (138). Cela permet de déduire un facteur multiplicateur correctif à appliquer à la réponse pour chacun des plots évalués (voir **Figure 45**).

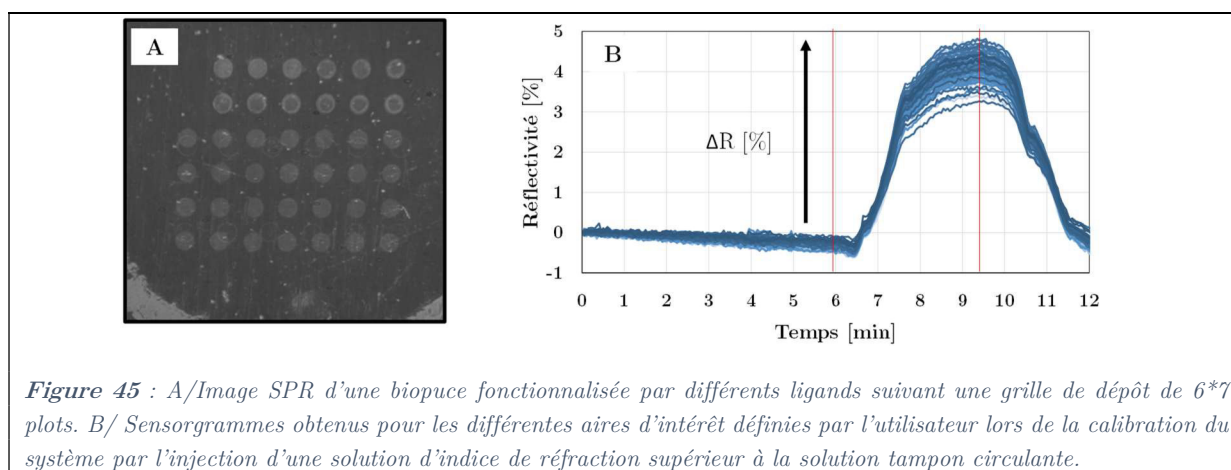
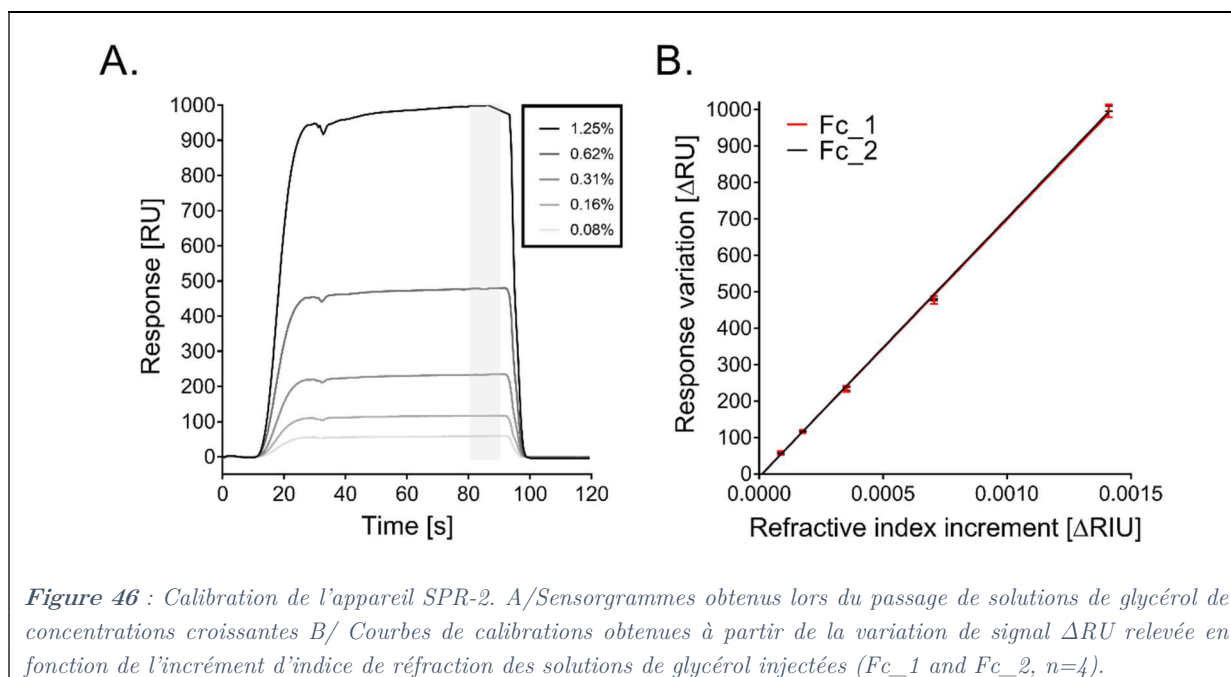


Figure 45 : A/Image SPR d'une biopuce fonctionnalisée par différents ligands suivant une grille de dépôt de 6*7 plots. B/ Sensorgrammes obtenus pour les différentes aires d'intérêt définies par l'utilisateur lors de la calibration du système par l'injection d'une solution d'indice de réfraction supérieur à la solution tampon circulante.

La calibration de l'appareil SPR-2 a été réalisée selon la même méthode en injectant des solutions de glycérol (réalisées dans un tampon PBST par pesée sur une balance analytique). Une solution mère à une concentration de 1,25 % (m/m) a été diluée et injectée à différentes concentrations afin d'évaluer les variations de signal ΔRU . En prenant en compte l'incrément d'indice de réfraction d'une solution de glycérol à 1% : $\Delta RIU=0,00113$, la calibration du système a été évaluée à $1,41 \pm 0.01 \cdot 10^{-6} [RU^{-1}]$. Cette valeur est proche de la valeur de $1.0 \cdot 10^{-6} [RU^{-1}]$ qui est décrite dans la littérature pour la calibration des appareils de SPR commerciaux (207).

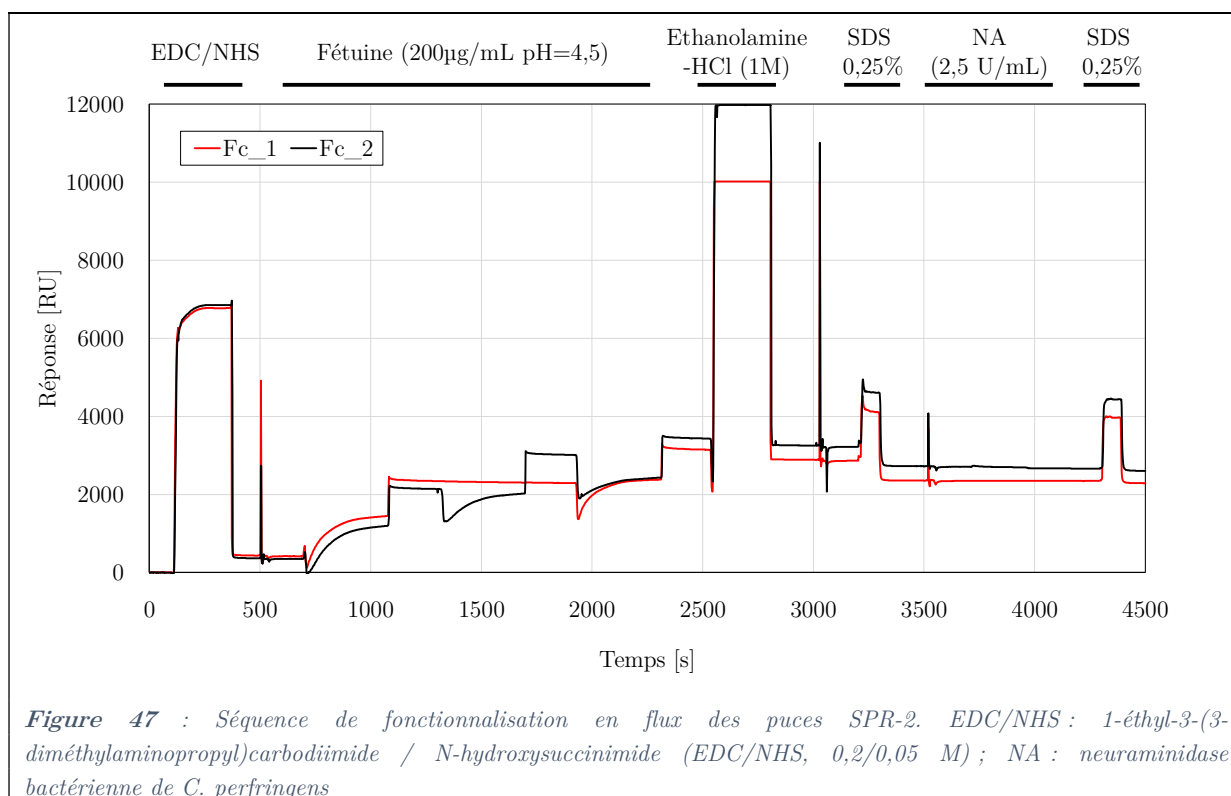


V.5. Ligands et méthodes d'immobilisation

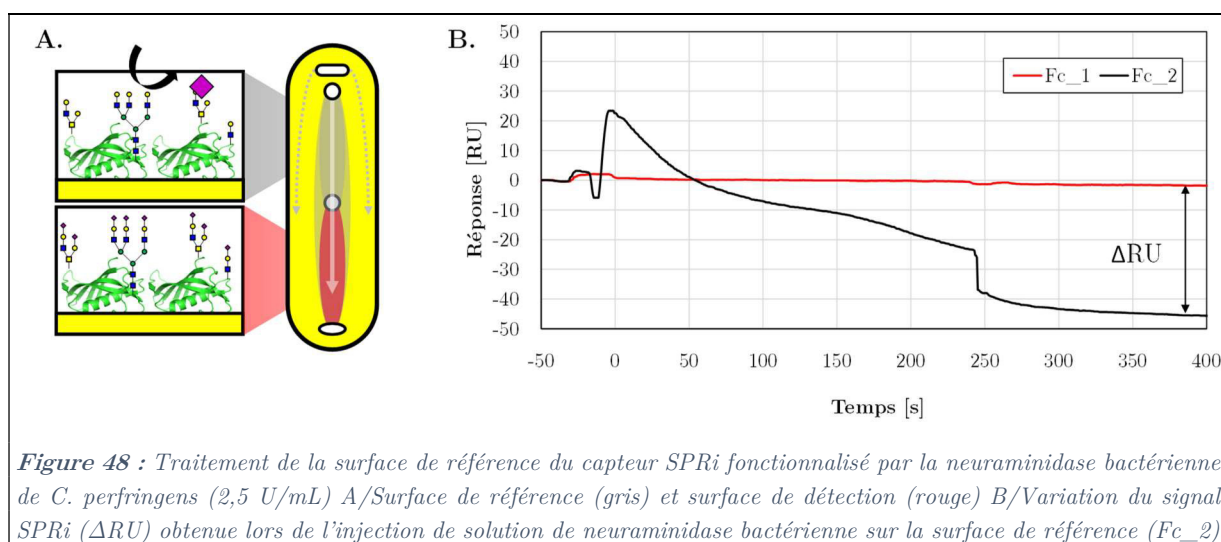
V.5.1. Fonctionnalisation des puces SPRi sur l'appareil SPR-2

L'appareil SPR-2 permet la fonctionnalisation en flux de la surface des capteurs utilisés. La

Figure 47 présente le protocole suivi pour la fonctionnalisation des puces SPRi.



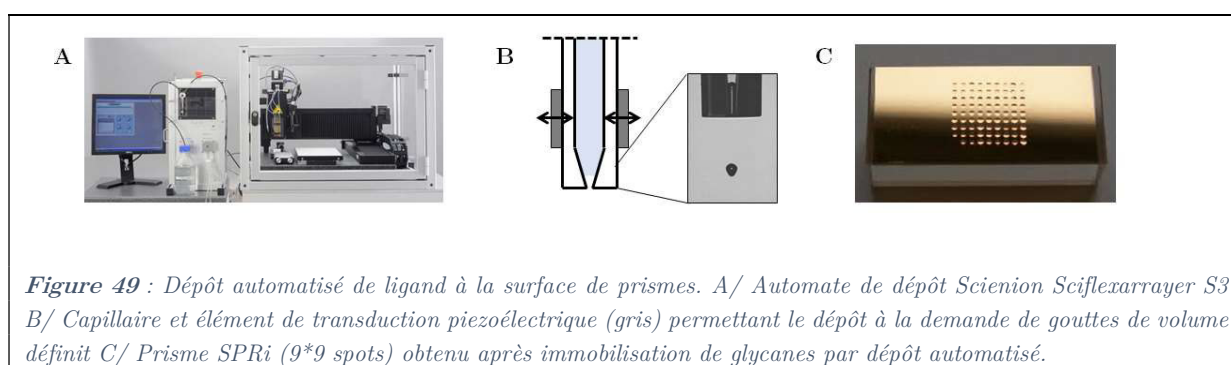
L'immobilisation des protéines est réalisée par greffage covalent sur une surface pré-fonctionnalisée avec des groupements acides carboxyliques. Les protéines ont été utilisées à une concentration de 200 µg/mL dans une solution tampon d'acétate de sodium 10 mM (pH = 4,5). L'activation des groupements acide carboxylique de la surface du capteur est réalisée par une solution d'EDC/NHS : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS, 0,2/0,05 M, 100 µL, 25 µL/min). Par la suite, une solution de fétuine est injectée de façon unique ou répétée sur les deux surfaces afin obtenir une densité surfacique immobilisée élevée. Les groupements acides carboxyliques activés par EDC/NHS n'ayant pas réagi sont désactivés par l'injection d'une solution d'éthanolamine-HCl (1 M, pH=8,5, 25 µL/min, 4 min). La solution de régénération (SDS 0,25%, 25 µL/min, 1 min) est ensuite injectée sur les deux surfaces pour désorber les protéines non greffées. Puis une solution de neuraminidase bactérienne (neuraminidase bactérienne de *C. perfringens*, 2,5 U/mL, 100µL, 25µL/min) est injectée sur la surface contrôle afin d'obtenir une lyse des acides sialiques terminaux des glycanes exposés par les protéines de fétuine immobilisées. L'inactivation totale de la surface par les conditions de lyse enzymatique décrites a été par la suite validée lors du passage de solutions de vaccin influenza (voir **Chapitre VI**).



V.5.2. Immobilisation de ligands sur biopuce SPR multiplexée

V.5.2.1. Automate de dépôt

Le dépôt de solutions de fétuine, BSA, de glycanes (voir **Tableau 17**) et d'anticorps (voir **Tableau 18**) sur les prismes SPRi a été réalisé à l'aide d'un automate de dépôt (Scienion Sciflexarrayer S3) basé sur le dépôt en mode « sans contact » de gouttes de volume de l'ordre de 100-300 pL par la technique de type « jet d'encre » actionné par effet piézoélectrique. Un ajustement de la fréquence de déformation et du voltage appliqué au cristal piézoélectrique permet de régler le volume des gouttes et leur position relative au capillaire (**Figure 49B**).

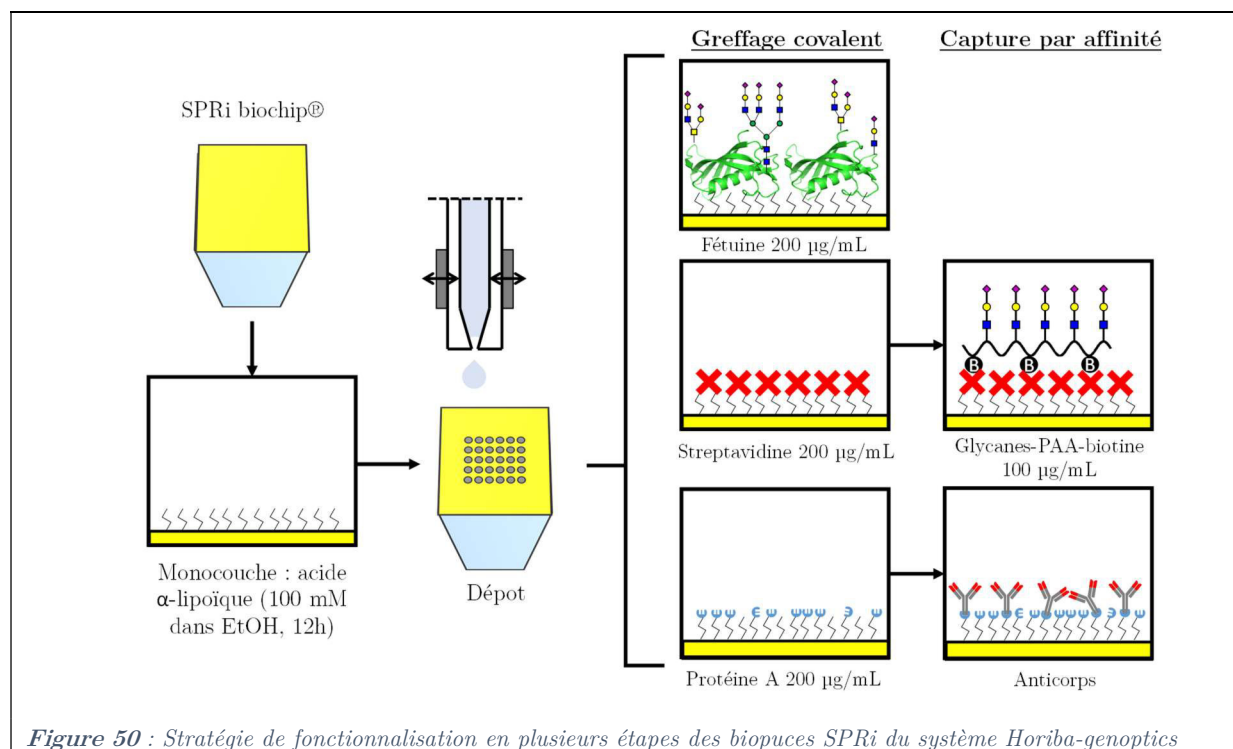


V.5.2.2. Traitement des prismes

Les prismes (SPRi Biochips, Horiba) ont été fonctionnalisés par formation d'une monocouche d'acide α -lipoïque (ou acide thioctique) à partir d'une solution à une concentration de 100 mM dans l'éthanol absolu anhydre par incubation pendant 10-12h à température ambiante (151). Cela permet d'obtenir une surface présentant des groupements acides carboxyliques exploitables pour le greffage de biomolécules. Avant réutilisation, les prismes ont été traités par oxydation grâce à une solution de *piranha* (mélange H_2O_2 : H_2SO_4 , 1:3 v/v, 2h) avant rinçage par l'eau distillée et séchage.

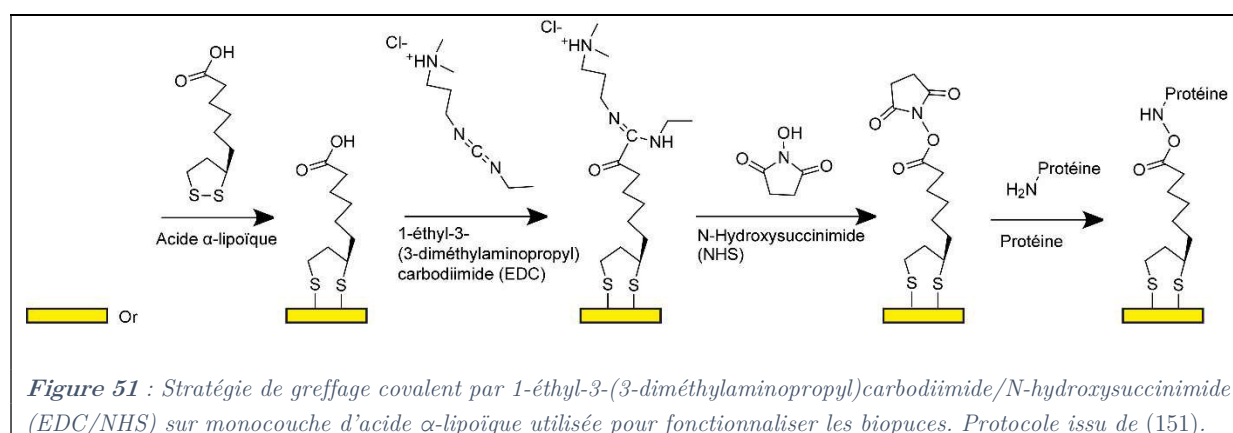
V.5.2.3. Stratégie de fonctionnalisation des biopuces

Différentes stratégies de fonctionnalisation ont été utilisées selon les ligands à immobiliser lors de la réalisation des biopuces multiplexées (voir **Figure 50**).



- Greffage covalent

Après activation de la surface par une solution de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide / N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS, 0,2/0,05 M), les solutions contenant les protéines à greffer ont été mises en contact avec la surface afin d'obtenir un greffage covalent par formation d'une liaison amide entre les groupements acides carboxyliques de la monocouche d'acide α -lipoïque et les groupements amines primaires de la fétuine ou la BSA (voir **Figure 51**). Les groupements n'ayant pas réagi sont inactivés par une solution d'éthanolamine-HCl (1M, pH=8,5).



• Capture par affinité

Les glycanes possédant un groupement biotine et les anticorps utilisés ont été immobilisés selon une stratégie de capture par affinité. Pour les glycanes biotinylés, la surface a été fonctionnalisée par greffage de streptavidine ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tampon acétate 10 mM pH=4,5). Pour les anticorps, la surface a été fonctionnalisée par greffage de protéine A (protéine A recombinante, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tampon acétate 10 mM pH=4,5). Des plots (« spots ») de streptavidine/protéine A ont été déposés sur les prismes par dépôt automatisé (dépôt de 20 gouttes de volume $\sim 150 \text{ pL}$: volume déposé de $\sim 3 \mu\text{L}$). Par la suite, les prismes sont laissés à incuber (1h, 4°C , humidité saturante) afin de permettre une réhydratation des plots et donc augmenter le temps permettant la réaction de greffage des ligands afin d'obtenir une densité surfacique de ligand élevée. Les prismes sont ensuite repositionnés sous l'appareil de dépôt afin de permettre les dépôts de solutions de glycanes biotinylés ou d'anticorps sur les plots correspondants en se basant sur la même grille de coordonnées spatiales (6*7 plots, espacement : $600 \mu\text{m}$, voir **Figure 52**).

Les glycanes utilisés ont été fournis par le *Consortium for functional Glycomics* (<http://www.functionalglycomics.org/>). Ils sont issus de synthèses chimiques réalisées par le *Scripps Institute* dans le but de produire des biopuces à glycanes (*glycan microarrays*). Certains glycanes (01-000 et 01-088, **Tableau 17**) ont également été acquis auprès de la société Glycotech (<http://www.glycotech.com/>).

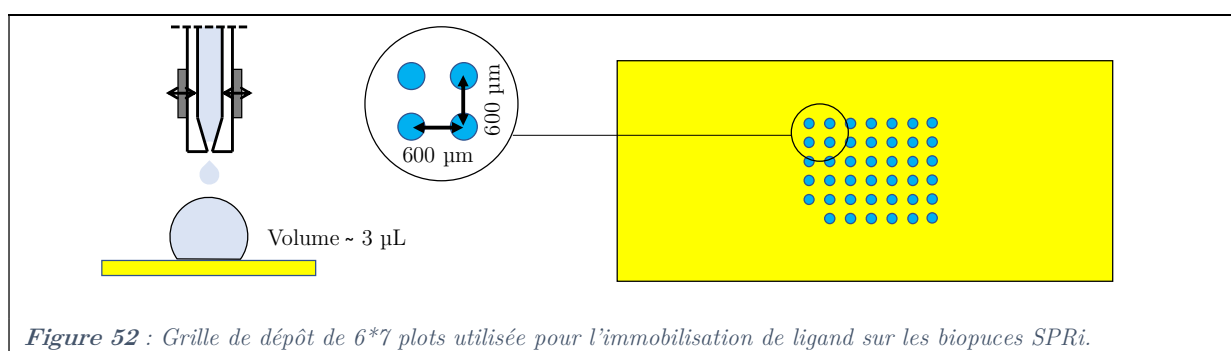


Figure 52 : Grille de dépôt de 6*7 plots utilisée pour l'immobilisation de ligand sur les biopuces SPRI.

Les glycanes ont été dilués à la concentration C_{stock} (cf. **Tableau 17**) dans du tampon TRIS-HCl à pH=8,5 avec ajout de TWEEN-20 ($C=0,005\%$ v/v) et conservés à $T=4^\circ\text{C}$. Pour le dépôt, les solutions de glycanes monovalents ont été diluées à la concentration de $500 \mu\text{M}$ et celles de glycanes multivalents à la concentration de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le même tampon (sur la base du protocole de McBride et al. (167)). Les protéines (Féruine et albumine de sérum bovin) ont été

diluées à la concentration de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tampon acétate 10 mM, pH =4,5). Les solutions d'anticorps ont été diluées à la concentration de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tampon PBS). Les solutions ont par la suite été déposées sur les plots pré-fonctionnalisés de streptavidine/protéine A afin d'obtenir les biopuces multiplexées (voir **Figure 50**). Les prismes ont été de nouveau laissés à incuber (1h, 4°C, 100% humidité), puis placés dans un dessiccateur sur la nuit.

V.6. Analyse d'hémagglutinine et de virus Influenza par SPRi quantitative simplex

V.6.1. Conditions d'analyse

Lors des analyses SPRi, le tampon utilisé était composé de PBS avec ajout de Tween 20 (0,05% v/v). Le débit de la phase mobile a été fixé à $25 \mu\text{L.min}^{-1}$. La température de la cellule fluidique a été fixée à 15°C, car il a été évalué que cette température offrait une perte d'activité de la surface inférieure à celle évaluée à 25°C lors de l'analyse de vaccin influenza. Un inhibiteur de la neuraminidase virale (carboxylate d'Oseltamivir) a été ajouté aux échantillons à la concentration de 10 μM avant analyse afin d'inhiber la lyse des acides sialiques exposés en surface de la fétuine immobilisée par la neuraminidase virale. Les conditions optimales de régénération de la surface ont été évaluées à l'aide de différentes solutions tampon en mesurant le % de retour à la ligne de base obtenu lors du passage de la solution selon la procédure recommandée par Biacore (147) (voir **Chapitre VI**). La régénération du capteur entre chaque analyse a été réalisée par une injection de 25 μL de solution de SDS à 0,25% v/v.

V.7. Autres méthodes analytiques

V.7.1. Quantification des protéines totales

Deux méthodes de dosage colorimétriques ont été utilisées pour la quantification des protéines totales des échantillons : le test de Bradford (208) et le test utilisant l'acide bicinchonique (ou BCA pour *BiCinchoninic acid Assay*) (209).

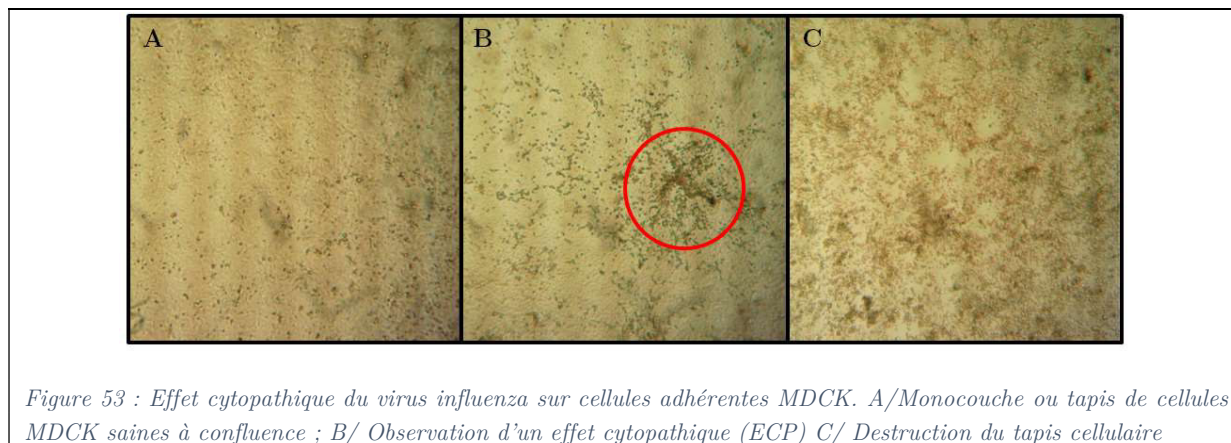
- Le réactif de Bradford contient du bleu de Coomassie. Ce composé a la capacité de se lier aux résidus basiques et hydrophobes des protéines en milieu acide. Cette interaction aboutit à un déplacement du maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm.

- Le sel de sodium d'acide bicinchonique est un composé stable et hydrosoluble capable de former un complexe violet intense avec un ion Cu^{1+} . Ces ions sont issus de la réduction des ions Cu^{2+} par les protéines dans un environnement alcalin (réaction de Biuret).

Une gamme étalon a été réalisée avec des solutions de BSA à des concentrations situées entre 0 et 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Un volume donné (20-50 μL) d'échantillon est incubé avec 1 ml du réactif de Bradford ou de réactif BCA (Bradford : 10 min - 25°C ; BCA : 30 min – 50°C). L'absorbance des solutions est ensuite mesurée (Bradford : $\lambda = 595 \text{ nm}$; BCA : $\lambda = 562 \text{ nm}$). La concentration en protéines dans les échantillons est exprimée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

V.7.2. Titrages infectieux

Deux méthodes de titrage infectieux des échantillons de virus *Influenza* ont été utilisées : la méthode des plages de lyses et la méthode de la Dose Infectante en Culture Tissulaire 50% (ou DICT_{50}). La méthode des plages de lyse évalue directement le nombre de particules virales infectieuses. La méthode DICT_{50} évalue elle le pouvoir cytopathogène d'un inoculum de particules virales.



V.7.2.1. Méthode des plages de lyse

Le dosage d'infectivité basé sur la méthode des plages de lyse (ou PFU - *Plaque Forming Unit*) est une mesure du nombre de particules virales capables de former des plages de lyse (ou « plaques ») par unité de volume. L'inoculum viral est dilué en série au $1/10^6$ dans le milieu d'infection (voir **Tableau 15**). Les dosages sont réalisés en plaque de culture cellulaire 6 puits. Après élimination du milieu de culture MDCK (voir **Tableau 15**), 800 μL de chaque dilution de virus sont déposés sur une culture de cellules MDCK confluentes puis incubés 1h sous

agitation constante (Agitateur à balancelle - 30 rpm). Le milieu d'infection est éliminé et les cellules recouvertes d'un milieu semi-solide (mélange 1:1 de milieu MEM et d'une solution d'Agar noble à la concentration de 1,1%). Ce milieu semi-solide a pour objectif de limiter la diffusion des particules virales néoformées. Les boîtes de culture sont mises à incuber 3 à 4 jours (37°C, 5% CO₂) avant dénombrement visuel des plages de lyses induites par effet cytopathique (ECP). Le titre est évalué selon la formule suivante, en faisant une moyenne sur les puits présentant des plages de lyse visibles et comptabilisables :

$$PFU.mL^{-1} = \frac{\text{Nombre de plages de lyse}}{F_{dilution} \times \text{volume déposé [mL]}}$$

V.7.2.2. Méthode de la Dose Infectante en Culture Tissulaire 50% (DICT₅₀)

Le titre DICT₅₀ mesure l'infectivité d'un inoculum de particules virale. L'inoculum viral est dilué en série au 1/10° (50 µL) dans 450 µL de milieu d'infection (voir **Tableau 15**) avant d'être déposé en quadruplicat (50µL) dans les puits d'une plaque de culture 96 puits de cellules MDCK (à confluence) contenant par ailleurs 150 µL de milieu d'infection. La lecture des titres est réalisée à 96 h post infection par comptage visuel du nombre de puits pour lesquels le tapis cellulaire est sain ou détruit (voir **Figure 53**). Le calcul de la DICT₅₀ s'effectue selon la méthode statistique de **Reed et Muench** (115).

V.7.3. Dosages d'activité

V.7.3.1. Immunodiffusion radiale

L'activité des lots de virus inactivés par fragmentation par le TRITON X-100 a été évaluée par immunodiffusion radiale (SRID) selon le protocole standard établi par Wood et al. (59). Les réactifs de référence utilisés pour la calibration ont été fournis par le *National Institute for Biological Standards and Control* (antigène NIBSC 09/196 et sérum polyclonal NIBSC 14/134 pour le dosage de lot de virus H1N1 A/California/07/2009 fragmenté).

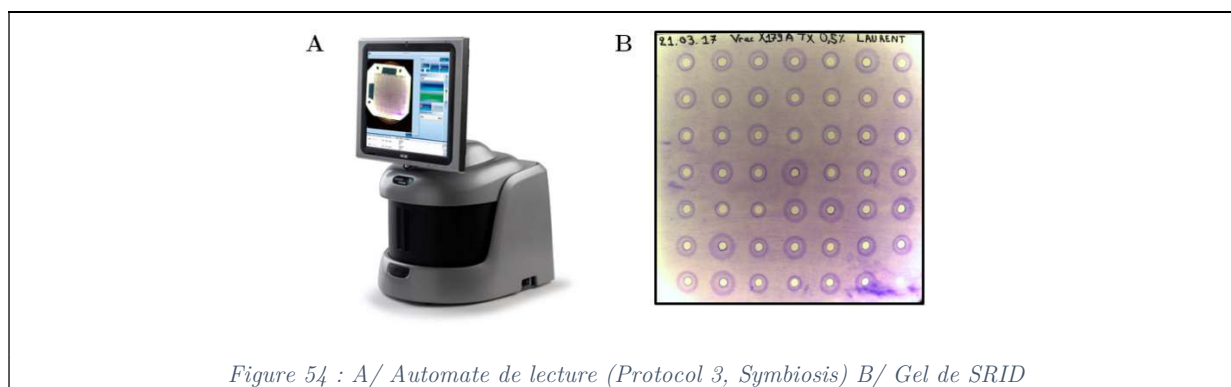
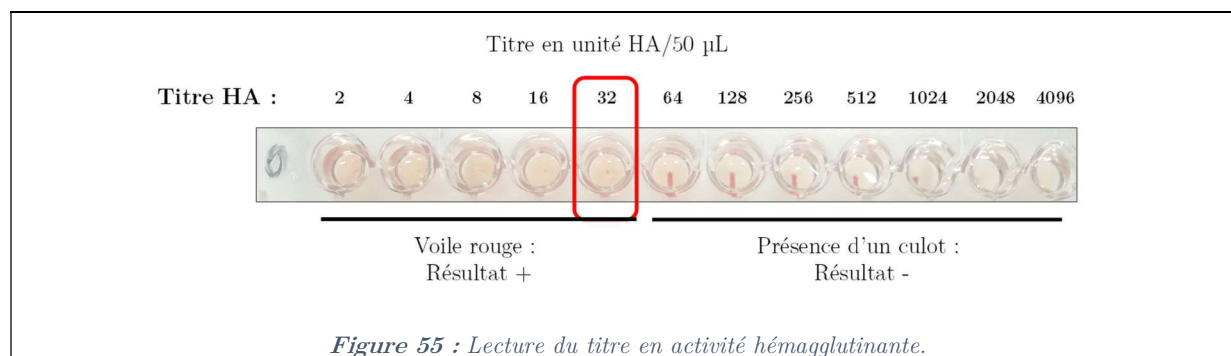


Figure 54 : A/ Automate de lecture (Protocol 3, Symbiosis) B/ Gel de SRID

Un gel d'indubiose A37 (1%, PALL) contenant le sérum polyclonal de référence (15 μL pour 1 mL) a été formé par dépôt sur une plaque de verre avant d'y percer des puits de diamètre ~ 4 mm. Les antigènes de référence et échantillons ont été incubés 30 min à température ambiante après ajout de Zwittergent 3-14 (1% final). Ces derniers ont été dilués au 1:1; 3:4; 1:2; 1:4 et déposés en triplicata dans les puits du gel. Le gel a été mis à incuber 20 h à 22 °C à l'étuve afin de permettre la migration des antigènes, puis lavé en tampon PBS. Le gel a ensuite été séché à l'aide de papier absorbant (30 min) puis à l'étuve (60°C – 20 min). Le gel a ensuite été teint afin de révéler les complexes d'immunoprécipitation (bleu de Coomassie 0,25%, méthanol 50%, acide acétique 10% v/v, 20 min). Le gel a ensuite été rincé et incubé dans une solution de lavage (méthanol 50%, acide acétique 10%). Les cercles d'immunoprécipitation ont été mesurés à l'aide d'un automate de lecture (Protocol 3, Symbiosis, voir **Figure 54**). L'activité HA a été évaluée en $\mu\text{g HA.mL}^{-1}$ par la méthode de l'analyse des lignes parallèles par comparaison des courbes effet-dose des échantillons et du réactif de référence.

V.7.3.2. Dosage d'activité hémagglutinante

Un dosage de l'activité hémagglutinante a été réalisé afin d'évaluer la perte d'activité des virus dans les surnageants de culture après incubation à 56°C. Le matériel utilisé est détaillé dans le **Tableau 16**. L'échantillon à doser (50 μL) est dilué en série au 1:2 dans du tampon Salk et incubé avec 50 μL de globules rouges de poule (préparés à 0,5% v/v dans du tampon Salk) une heure à température ambiante. Le titre HA évalué correspond à l'inverse de la dernière dilution pour laquelle une hémagglutination totale ou partielle est observée (équivalent à une absence de précipitation des globules rouges en fond de puit) et est exprimé en unités HA/50 μL . La **Figure 55** détaille comment est réalisée la lecture de titre sur plaque 96 puits.



V.7.3.3. Dosage d'activité neuraminidase

Des dosages d'activité neuraminidase d'échantillons de virus influenza et de vaccin ont été réalisés avec un lecteur de fluorescence FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). L'activité totale NA a été évaluée comme la quantité d'acide 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acétylneuraminique (MUNANA, Sigma) dégradée en 4-methylumbelliférone (4-Mu) en 1 h pour un mL de suspension virale (nmol 4-Mu/h/mL).

V.7.4. Densitométrie

La quantité totale de HA présente dans les surnageants de culture a été évaluée par densitométrie après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (*SDS-PAGE*) et immunomarquage. Les échantillons ont été traités par ajout de tampon de lyse (tampon commercial : NuPAGE™ LDS 4X, à base de lithium dodecyl sulfate à pH = 8,5), puis ajout de dithiothréitol (DTT, 1% v/v final). Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 5 min. Un volume défini (35 μ L) d'échantillon a ensuite été déposé dans les puits d'un gel SDS-PAGE 10% avant migration (Tampon Tris-HCl pH=8,5, 110V, 1h30) et transfert sur membrane de nitrocellulose. Un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-HA (F211-10A9 et F211-11H12) développés par Manceur et al. a été utilisé comme anticorps primaires (96) dans les conditions indiquées dans le **Tableau 24**.

L'analyse par densitométrie a été réalisée à partir des films scannés sur le logiciel Image Studio (LICOR Biosciences, Lincoln, NE). Afin de procéder à une analyse quantitative, une gamme de calibration a été réalisée à partir de deux échantillons de référence en parallèle des échantillons de surnageant issus des productions virales : HA recombinante purifiée, exprimée en système HEK293 (H1N1 A/California/2009/07, voir

Tableau 20) et vaccin tétravalent commercial (Vaxigrip® Tetra 2018-2019, Sanofi Pasteur).

Tableau 24 : Détails des étapes de l'immunomarquage d'hémagglutinine de virus Influenza

Etape	Tampons/réactifs	Spécifications
Saturation de la membrane	PBS-TWEEN 0,1% - lait 5%	1h – agitation – T° ambiante
Marquage anticorps primaires	F211-10A9, F211-11H12 (2µg/mL) dans PBS-TWEEN 0,1% - lait 5%	Incubation : 4°C sur la nuit Lavage : 3 x PBS-TWEEN 0,1%
Marquage anticorps secondaire	Anticorps anti-souris couplés à la HRP (NXA931V-1ML, GE) - 1/5000° dans PBS-TWEEN 0,1% - lait 5%	Incubation : 1h – agitation – T° ambiante Lavage : 2 x PBS-TWEEN 0,1%, 1X PBS
Révélation	Membrane : Hamersham Hyperfilm Réactif : Pierce® ECL	20-30 min

V.7.5. Analyse des particules totales

Différentes techniques analytiques ont été utilisées pour la caractérisation et la quantification des échantillons de particules virales. De même que pour les dosages d'activité, les titres obtenus ont permis d'établir des corrélations avec les titres obtenus par SPRI.

- **Analyses *TRPS***

Des analyses TRPS ont été réalisées via une prestation à l'aide de l'appareil qNano Gold (IZON Science, Lyon, France). Les échantillons ont été dilués au 1/5 dans du tampon PBS avant analyse en duplicat. Des membranes en polyuréthane possédant des pores de taille ajustable d'un diamètre basal de 150 nm (NP150, IZON) ont été utilisées. Avant analyse des échantillons, des calibrations ont été réalisées par passage de suspensions standards constituées de nanosphères de polystyrène de 150 nm de diamètre modal (CPC150, IZON).

V.8. Montage réalisé pour le suivi *en-ligne*

Afin de réaliser un suivi *en-ligne* des cinétiques de productions virales de cultures T-17 (voir **Chapitre VIII**), une ligne de prélèvement et de purification automatisée a été mise au point et évaluée. La **Figure 56** présente le montage réalisé.

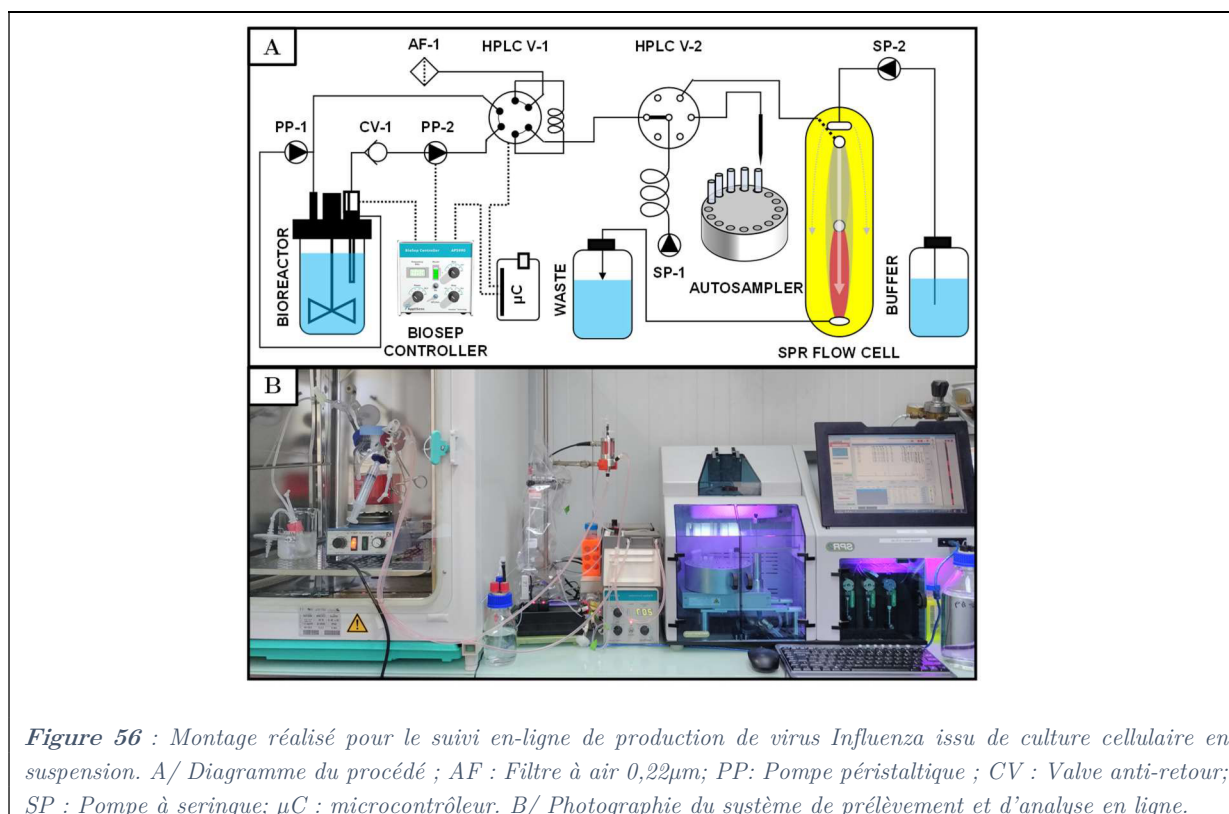


Figure 56 : Montage réalisé pour le suivi en-ligne de production de virus Influenza issu de culture cellulaire en suspension. A/ Diagramme du procédé ; AF : Filtre à air 0,22μm; PP: Pompe péristaltique ; CV : Valve anti-retour; SP : Pompe à seringue; μC : microcontrôleur. B/ Photographie du système de prélèvement et d'analyse en ligne.

V.8.1. Réacteur de production virale

Les cultures de cellules T-17 en moyen volume ont été réalisées dans un flacon de volume 500 mL équipé d'un système d'agitation à hélice entraînée par un barreau aimanté (Bellco, 500 mL *spinner Flask*). Le bioréacteur a été placé dans un incubateur avec un agitateur magnétique (37°C, 5% CO₂, 120 RPM). Le flacon agité a été équipé d'entrées/sorties permettant l'installation d'une boucle d'échantillonnage grâce au système de filtration acoustique automatisée Biosep (voir V.8.1).

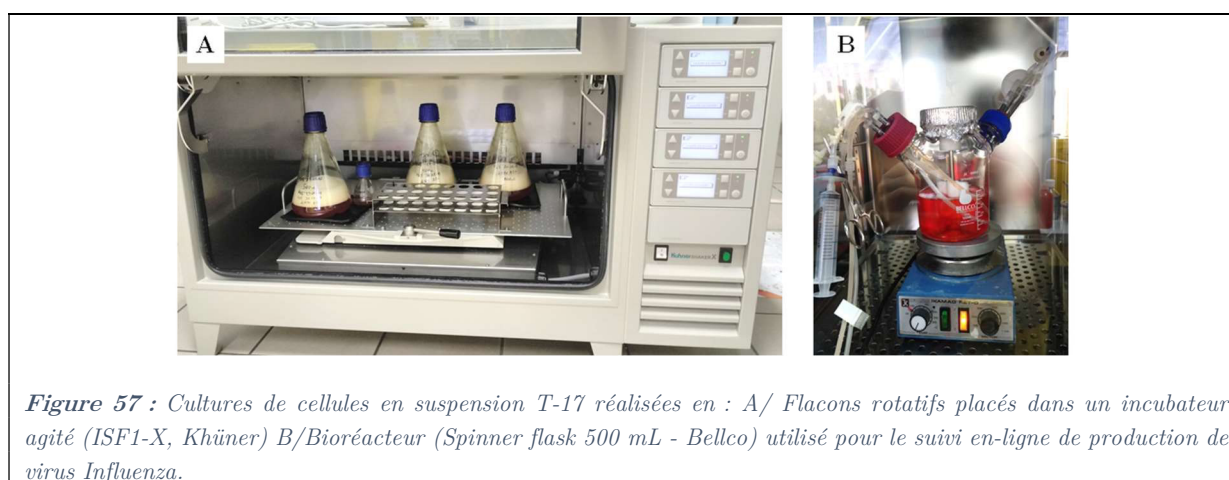
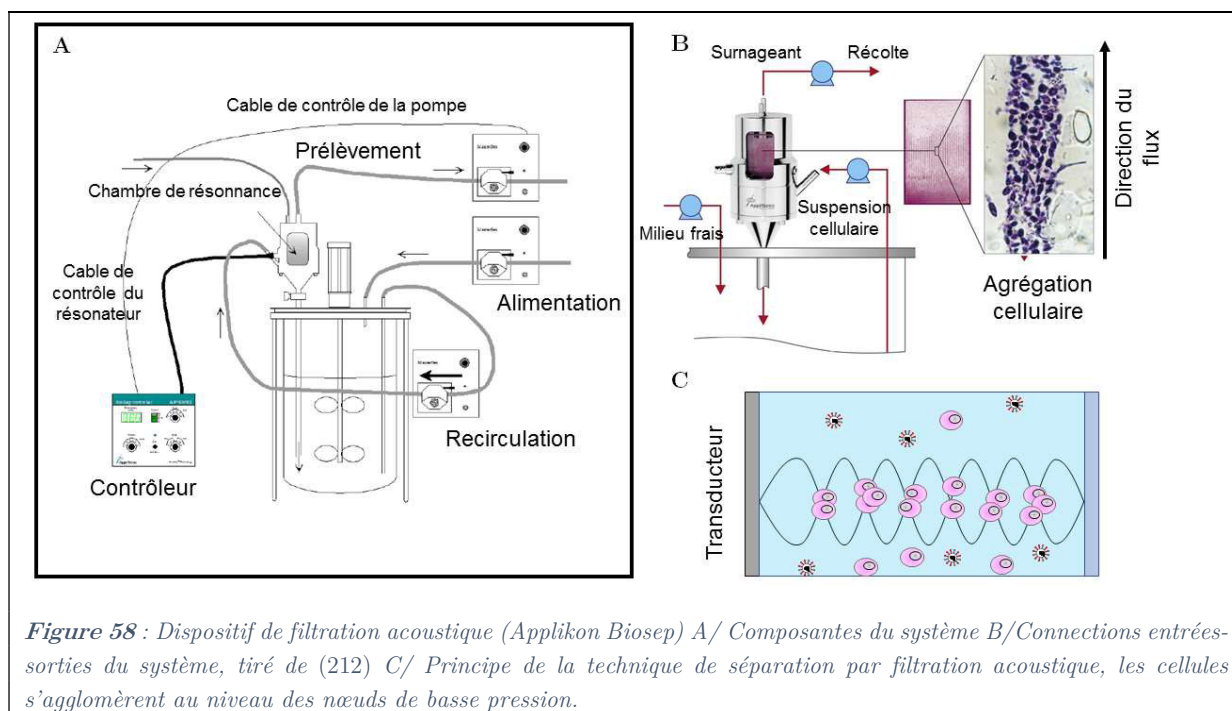


Figure 57 : Cultures de cellules en suspension T-17 réalisées en : A/ Flacons rotatifs placés dans un incubateur agité (ISF1-X, Khüner) B/Bioréacteur (Spinner flask 500 mL - Bellco) utilisé pour le suivi en-ligne de production de virus Influenza.

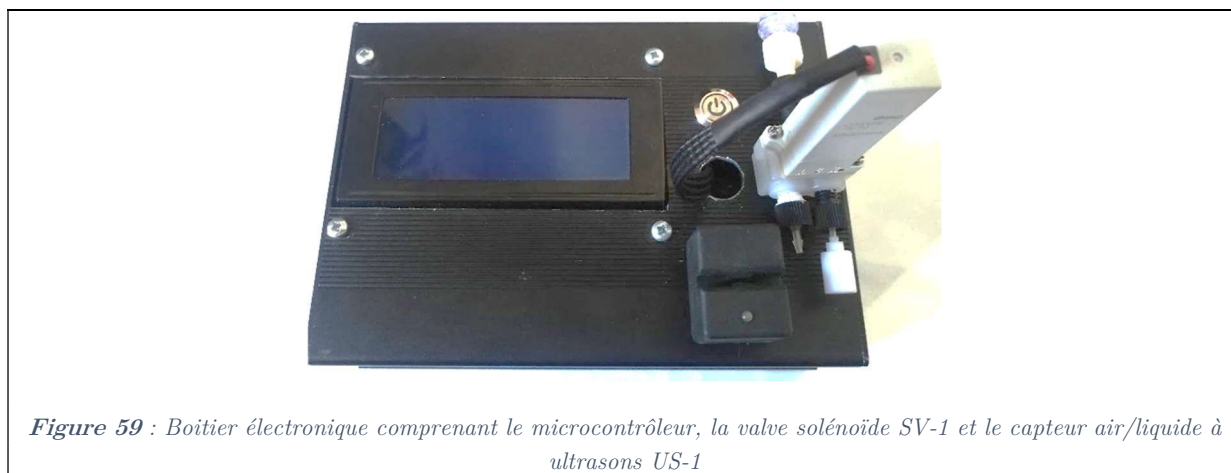
V.8.2. Filtration acoustique

La clarification automatisée des échantillons prélevés dans le bioréacteur a été réalisée par filtration acoustique (210) (voir **Figure 58C**). Un dispositif de filtration acoustique (Biosep 10 L, Applikon Inc., Foster City, USA) a été alimenté par deux pompes péristaltiques (P-1, GE Healthcare) utilisées pour la circulation de milieu à travers le dispositif (211). Le débit de la pompe de recirculation a été fixé à 6 mL/min et celui de la pompe de prélèvement à 2 mL/min (temps de prélèvement : 10 min ; temps de « repos » : 20 min), conformément aux recommandations du fournisseur. La puissance du transducteur a été fixée à 2W. Une efficacité de séparation de 90-95% a été évaluée par comptage visuel sur une suspension de cellules T17 à une concentration de 1.10^6 cell.mL⁻¹, selon la formule : $ES [\%] = 100\% \times \left(1 - \frac{C_{pr\acute{e}l\acute{e}vement}}{C_{milieu}}\right)$.



V.8.3. Interfaces électroniques et communications

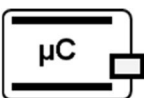
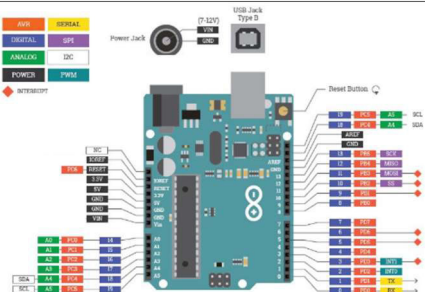
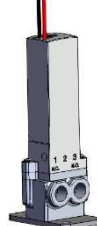
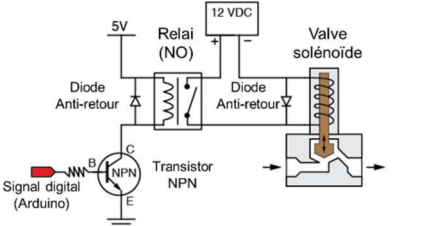
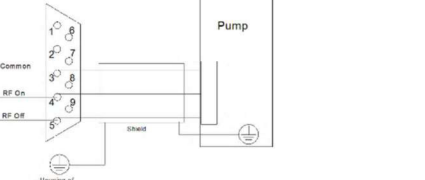
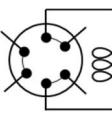
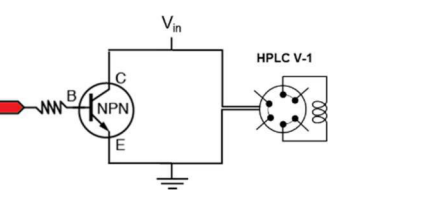
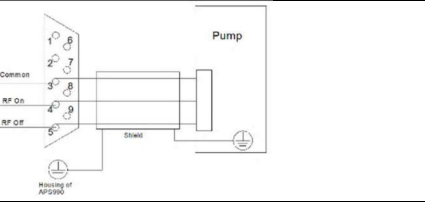
Un boîtier électronique a été développé afin de permettre l'acquisition, l'évaluation et l'émission de signaux électroniques (analogiques et digitaux) issus des différentes composantes du montage réalisé pour le suivi en-ligne de production virale (**Figure 59**). Le **Tableau 25** présente les différentes interfaces électroniques du système. Le boîtier inclut une carte microcontrôleur, un détecteur air/liquide et une valve solénoïde 3 voies.



Le microcontrôleur permet le contrôle de la valve HPLC (HPLC-V1, voir **Figure 60**) en fonction de l'état de fonctionnement du système de prélèvement Biosep. Le signal émis par le contrôleur Biosep et permettant d'activer la pompe de prélèvement (voir **Figure 58A**) est acquis en entrée de la carte Arduino. L'ouverture/fermeture de la valve HPLC est contrôlée par la carte (voir **Tableau 25** pour le détail) de manière synchrone à l'activation/inactivation du système Biosep.

Une séquence de prélèvement (aspiration/refoulement) est réalisée à intervalle de temps régulier par la pompe à seringue du système SPR-2 afin de recueillir l'échantillon issu de la boucle HPLC dans le passeur d'échantillon de l'appareil SPR. Le détecteur air/liquide permet de synchroniser le prélèvement d'un volume d'échantillon fixe de la boucle HPLC avec le changement d'état de la valve solénoïde 3 voies. Cela permet le prélèvement de solution tampon (PBS) utilisée pour diafiltrer l'échantillon par aspiration/refoulement à travers la cassette de filtration tangentielle équipée de valves anti-retour.

Tableau 25 : Alimentations et communications entrées/sorties des composantes électroniques du système développé. Les schémas de branchement électronique du contrôleur Biosep, du détecteur Air/liquide et de la pompe péristaltique sont issus des manuels d'utilisation respectifs (212–214)

Composante	Illustration	Communication Entrée/sorties	Interface électronique
Carte Microcontrôleur 		Alimentation : 9V Communications : - Détecteur air/liquide - Valve solénoïde - Contrôleur Biosep - Valve HPLC	
Détecteur air/liquide 		Alimentation : 5V (vcc/return) Communication : 5V logique (Output > vers Arduino)	
Valve solénoïde 3 voies 		Alimentation : 12V (circuit externe contrôlé par un relai) Relai (NO : Normalement Ouvert) activé par un signal en sortie de la carte Arduino	
Contrôleur Biosep 		Alimentation : 220V Communication : ON/OFF avec la pompe péristaltique et la carte arduino	
Valve HPLC automatique 		Alimentation : 220V Communication : ON/OFF (Contrôle du bouton poussoir via une sortie digitale de la carte arduino)	
Pompe péristaltique 		Alimentation : 220V Communication : ON/OFF avec le contrôleur Biosep	

V.8.4. Filtration tangentielle automatisée

Nous avons cherché à développer et évaluer un dispositif de filtration tangentielle automatisée pour la diafiltration/concentration de virus influenza issu de culture de cellules en suspension afin de réaliser une purification des échantillons de surnageant de culture cellulaire avant analyse SPRi (voir **Chapitre VIII**). La filtration membranaire a été réalisée sur des modules d'ultrafiltration à fibres creuses avec un seuil de coupure (*Molecular Weight Cut-Off* : MWCO) de 750 kDa (Microkros, C02-E750-05-N, Spectrum Labs, **Tableau 26**). Les performances du module ont été évaluées. Premièrement, 100 mL de surnageant de culture T-17 ont été concentré 100x et diafiltrés (manuellement à l'aide de seringues suivant les recommandations du fournisseur) dans du PBS pour un volume de rétentat collecté de 1ml. Nous avons pu évaluer le rendement de purification du module sur la base de la concentration en particules virales (dosage PFU) de l'échantillon et du filtrat. Un dispositif de filtration tangentielle automatisée basée sur le module C02-E750-05-N a ensuite été développé (voir **Figure 60**) par connexion du module à l'appareil SPR-2. Les performances du dispositif automatisé pour la diafiltration des contaminants de nature protéique présents dans le surnageant de culture ont été évaluées sur la base de la diminution de la concentration en protéines totales (dosage BCA) d'un échantillon de milieu de culture Optipro de volume 500 μ L en fonction du nombre de cycles d'aspiration/refoulement réalisé par la pompe à seringue SP-1 de l'appareil SPR-2 (voir **Figure 60B**). La présence du détecteur air/liquide (**US-1**) permet le changement de position de la valve solénoïde 3 voies après aspiration de l'échantillon dans le système, afin que la pompe SP-1 aspire ensuite un volume défini de tampon PBS. L'emplacement des valves de fluide anti-retour (**CV-1** et **CV-2**) permet ensuite une concentration/diafiltration de l'échantillon avec un volume défini de tampon PBS suivant le nombre de cycles d'aspiration/refoulement. Le filtrat est ensuite injecté au niveau du passeur d'échantillon de l'appareil SPR-2.

Tableau 26 : Spécifications du module de filtration tangentielle utilisé

Référence	MWCO	# Fibres	Longueur [cm]	Diamètre interne [cm]	Aire [cm ²]
C02-E750-05-N	750 kDa	6	20	0,05	18,8

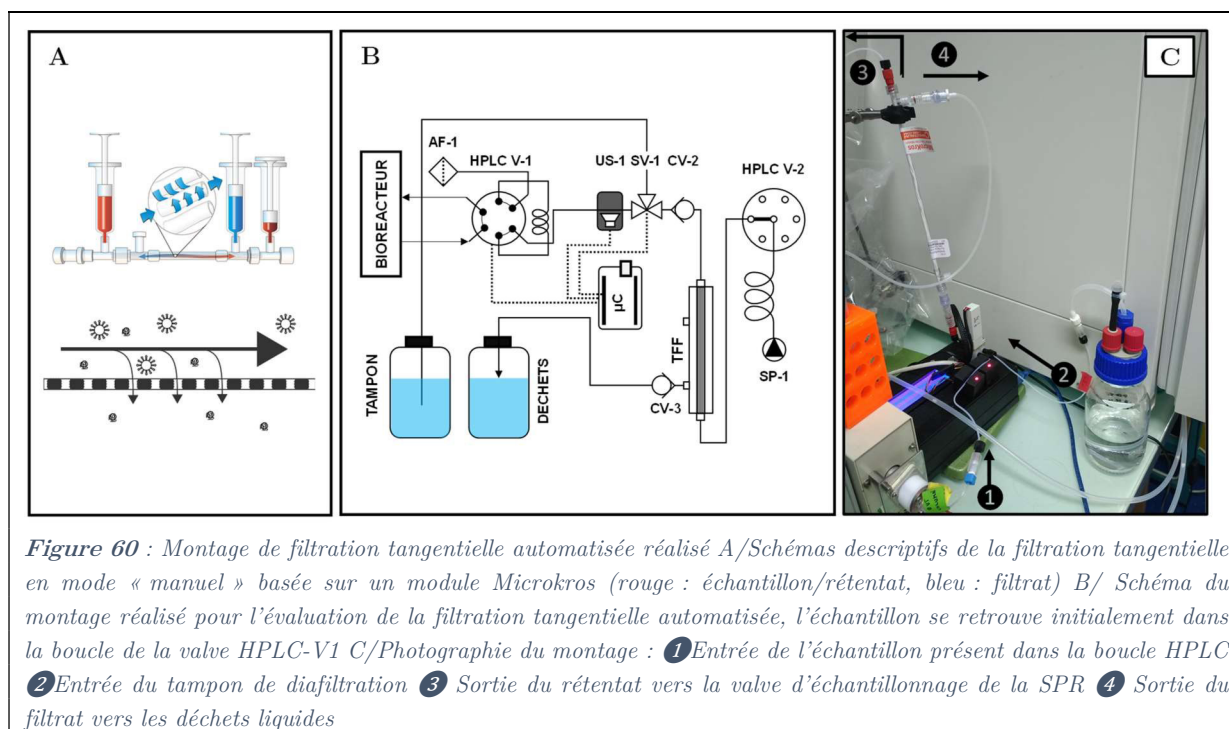


Figure 60 : Montage de filtration tangentielle automatisée réalisé A/ Schémas descriptifs de la filtration tangentielle en mode « manuel » basée sur un module Microkros (rouge : échantillon/rétentat, bleu : filtrat) B/ Schéma du montage réalisé pour l'évaluation de la filtration tangentielle automatisée, l'échantillon se retrouve initialement dans la boucle de la valve HPLC-V1 C/ Photographie du montage : ❶ Entrée de l'échantillon présent dans la boucle HPLC ❷ Entrée du tampon de diafiltration ❸ Sortie du rétentat vers la valve d'échantillonnage de la SPR ❹ Sortie du filtrat vers les déchets liquides

VI.

DEVELOPPEMENT D'UN TEST

SPRI QUANTITATIF POUR LE

SUIVI DES PRODUCTION

VACCINALES D'INFLUENZA

VI.1. Introduction

Ce chapitre détaille le développement d'un test SP_{Ri} quantitatif dédié à l'analyse de vaccin et de virus Influenza. Il est présenté sous la forme d'une publication scientifique, publiée dans la revue *Vaccine* et intitulée : ***SP_{Ri}-based hemagglutinin quantitative assay for influenza vaccine production monitoring***. L'objectif de ce travail était d'apporter une preuve de concept de l'utilisation de la SP_{Ri} quantitative pour l'évaluation des cinétiques de production de virus Influenza actif produit par culture cellulaire.

La SP_{Ri} a préalablement été utilisée pour l'évaluation des paramètres cinétiques des interactions biomoléculaires entre la HA virale d'Influenza et des glycanes ou protéines glycosylées. Par ailleurs, différents travaux ont décrit le développement de tests SPR quantitatifs dédiés au dosage d'activité de vaccin Influenza (65,102) (voir **Chapitre III**).

Dans un premier temps, nous avons cherché à développer et évaluer un test analytique SP_{Ri} permettant de quantifier la HA virale bioactive. Différents matériels de référence, produits au sein du laboratoire (VRAC : lot de virus inactivé par fragmentation au détergent) ou acquis (vaccin commercial, HA recombinante) ont été utilisés afin de développer ce test analytique. Le vaccin commercial est un réactif purifié avec une concentration en HA élevée (90 µg HA.mL⁻¹), formulé grâce à la méthode de référence (SRID). Ce dernier nous a donc semblé particulièrement intéressant pour le développement et l'évaluation du test SP_{Ri}. Nous avons évalué différentes solutions de régénération afin de pouvoir procéder à des cycles d'analyse multiples avec un même capteur. La spécificité du test pour la mesure des interactions entre la HA active et les glycanes présentant une extrémité terminale acide sialique a été validée. Nous avons alors pu évaluer les paramètres analytiques (sensibilité, gamme de mesure, reproductibilité) offerts par le test développé pour du matériel de type « vaccin ».

Dans un second temps, nous avons cherché à évaluer la réponse obtenue lors de l'analyse de particules virales entières. Pour cela, des échantillons de virus ont été produits en culture MDCK et analysés par SP_{Ri} et par différentes techniques permettant l'évaluation des particules infectieuses (PFU, DICT₅₀) et totales (TRPS). Enfin, nous avons utilisé la méthode SP_{Ri} développée pour l'évaluation des cinétiques de production en culture MDCK et cherché à établir

des corrélations entre la réponse SPRI et les titres en particules infectieuses et totales évalués au cours de la culture cellulaire.

VI.2. Manuscrit

Vaccine 37 (2019) 1614–1621



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



SPRI-based hemagglutinin quantitative assay for influenza vaccine production monitoring

Laurent Durous^{a,b}, Thomas Julien^{b,c}, Blandine Padey^b, Aurélien Traversier^b, Manuel Rosa-Calatrava^{b,c}, Loïc J. Blum^a, Christophe A. Marquette^{a,*}, Emma Petiot^{a,d}

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

^b Laboratoire Virologie et Pathologie Humaine – VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

^c VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon 69008, France

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



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2018

Received in revised form 15 January 2019

Accepted 28 January 2019

Available online 14 February 2019

Keywords:

Bioprocess

Hemagglutinin

Influenza vaccine

Surface Plasmon Resonance imaging

Influenza virus

Process Analytical Technology

ABSTRACT

Influenza vaccine manufacturers lack tools, whatever the involved production bioprocess (egg or cell-based), to precisely and accurately evaluate vaccine antigen content from samples. Indeed, the gold standard single-radial immunodiffusion (SRID) assay, which remains the only validated assay for the evaluation of influenza vaccine potency, is criticized by the scientific community and regulatory agencies since a decade for its high variability, lack of flexibility and low sensitivity. We hereby report an imaging surface plasmon resonance (SPRI) assay for the quantification of both inactivated vaccine influenza antigens and viral particles derived from egg- and cell-based production samples, respectively. The assay, based on fetuin-hemagglutinin interactions, presents higher reproducibility (<3%) and a greater analytical range (0.03–20 µg/mL) than SRID for bulk monovalent and trivalent vaccine and its limit of detection was evaluated to be 100 times lower than the SRID's one. Finally, viral particles production through cell culture-based bioprocess was also successfully monitored using our SPRI-based assay and a clear correlation was found between the biosensor response and total virus particle content.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The influenza vaccine manufacturing field is presently strongly lacking updated, rapid and reliable quantification tools to evaluate both vaccine lot potency and support new production process developments via the in-process quantification of bioactive virus particles.

Presently, influenza vaccine lots release relies on the off-line gold standard single-radial immunodiffusion (SRID) assay [1]. SRID requires strain-specific reference sera and antigen reagents to determine the µg amount of influenza hemagglutinin (HA) antigen from fragmented virus preparations. The annual preparation of SRID reagents takes up to 6 months and constitutes critical bottleneck for the release of vaccine lots [1–3]. This is why, WHO and regulatory agencies are strongly supporting the development of improved influenza vaccine potency assays [4,5] to speed up the vaccine lot release especially in the case of a pandemic outbreak.

A large set of analytical technologies has been evaluated to replace or complement SRID. Various immunoassays including ELISA, latex bead agglutination or slot-blot were developed with either specific monoclonal antibodies or reference sera to target influenza antigen epitopes [6–8]. Alternative chromatography-based strategies, like RP-HPLC and LC-MS, were also proposed to directly quantify HA content in vaccine preparations [9,10].

On the other hand, current influenza vaccine production mainly relies on embryonated egg-based technology. Such manufacturing process is challenged every year by vaccine reformulation, the reduced production yields of several influenza strains in eggs as well as the recurrent threat of a new pandemic outbreak [4,5]. Alternative production processes based on cell culture have been successfully developed in recent years to complement egg-based technology. Thus several mammalian cell lines were evaluated and the MDCK cell is now the sole mammalian cell line validated for the production of FlucelVax[®] vaccine [11–14]. Nevertheless, when it comes to optimization and monitoring of such cell-based processes, manufacturers are presently lacking in-process analytical tools to follow the virus particle production level. This time, analytics aims to monitor virus particle release, both infectious

* Corresponding author at: Bat. Lederer, 1 rue Victor Grignard, 69100 Villeurbanne, France.

E-mail address: christophe.marquette@univ-lyon1.fr (C.A. Marquette).

and non-infectious. Unfortunately, although non-infectious particles could represent 10–1000 times the number of infectious viral particles [15,16], standard methods are only quantifying infectious particles thanks to infectivity assays. Such assays are not appropriated for in-process and on-line monitoring.

As non-infectious particles appear to have a major contribution in final HA antigen content, several quantification technologies were evaluated to assess the total viral particles (VP) content for production process monitoring. Among physical quantification techniques proposed for VP evaluation, one can cite Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Tuneable Resistive Pulse Sensing (TRPS), Flow Virus counter and Field-Flow Fractionation combined to Multi-Angle Light Scattering (FFF-MALS) [17]. These techniques present several advantages such as reduced analysis time (minutes-hours vs. days) and increased reproducibility. Their weaknesses stand on a low specificity and/or on the absence of information regarding HA bioactivity. The only assays reported in the literature able to combine both advantages are quantitative surface plasmon resonance (SPR) assays [18,19].

SPR is commonly used to characterize biomolecular interactions and has been extensively used to determine affinity constants of influenza hemagglutinins toward a large panel of ligands. However, while SPR has already proven its potential for label-free quantitative evaluation of bioactive antibodies and recombinant proteins produced in cell culture [19,20], very few studies were performed on the use of SPR-based assay for quantitative evaluation of influenza hemagglutinin antigens or virus particles [2,21].

The present work is dedicated to the development of a SPR-based assay for the rapid and label-free quantification of both influenza virus particles and hemagglutinin antigen content in influenza vaccine preparations. Based on immobilized fetuin, a protein containing generic sialic acid ligand of hemagglutinin influenza viruses, we developed a quantitative assay harboring high specificity and reproducibility with both egg-based influenza inactivated vaccine and virus particles produced by cell-based systems. Moreover, attention has been given to the regeneration capability of the biosensor surface, leading to the further development of an on-line real-time monitoring system for cell-based virus bio-production processes [22].

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Fetuin from fetal bovine serum, bovine serum albumin, ethyl dimethyl carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), sodium dodecyl sulfate (SDS), polysorbate 20, Triton-X100, bacterial neuraminidase from *C. perfringens* and trypsin acetylated from bovine pancreas were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium acetate buffer and ethanolamine-HCl were acquired from Sierra sensors (Hamburg, Germany). Zwittergent 3–14 and Phosphate Buffer Saline (PBS) tablets were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions were prepared using milliQ water. Oseltamivir carboxylate was purchased from Roche (Bale, Switzerland). Trivalent inactivated vaccine was purchased from Sanofi Pasteur (Vaxigrip® 2016/2017, lot #N2A381M, Sanofi Pasteur, Lyon, France) and recombinant A/California/04/2009 hemagglutinin from Sinobiological (Beijing, China). Madin–Darby canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL34), serum-free Ultra-MDCK and EMEM media, L-glutamine and penicillin/streptomycin solutions were from Lonza (Amboise, France). Optipro, SFM4Transfx-293 and 2X MEM media, Nobel agar, Coomassie blue and BCA assay reagents were from Thermo Fisher (Dardilly, France). Bio-beads SM2 were purchased from Bio-RAD (Les Ulis, France). SRID standard antigen (NIBSC 09/196 and NIBSC 12/114) and polyclonal serum

(NIBSC 14/134) for H1N1 A/California/7/2009 and H3N2 A/Victoria/361/2011 were obtained from NIBSC (<http://www.nibsc.org>).

2.2. SPR imaging system

SPR imaging experiments were performed using a SPR-2 instrument (Sierra Sensors, Hamburg, Germany). The sensor is based on Kretschmann configuration and consists in a microfluidic flow cell and a gold-coated prism functionalized with carboxylic acid groups (Amine coupling sensor, Sierra Sensors) useful for ligand immobilization. Biomolecular interactions at the surface of the sensor lead to changes in local refractive index. Recorded images of the flow cell are processed in order to obtain a numerical signal and generate sensorgrams expressed in response unit [RU].

Raw SPR data expressed in RU were processed through a custom MATLAB (The Mathworks, Natick, USA) script for interpolating and smoothing/despiking. Sensorgrams were obtained by first subtracting the signal from the reference surface to the signal from sensing surface for each sample in order to obtain standardized data. Initial binding rates [RU/s] were calculated based on the slope of the referenced sensorgrams for the first 30 s of the association phase, while response level was determined as the maximum response at the end of the association phase.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were subsequently determined based on the following equations, where σ was the standard deviation of 3 consecutive injections of negative control sample (0 μ g HA/mL):

$$LOD = \frac{3.3\sigma_{BLANK}}{slope}; \quad LOQ = \frac{10\sigma_{BLANK}}{slope}$$

The negative control consisted of SPR buffer (PBS Tween 20 0.05%) containing oseltamivir at a concentration of 10 mM for the analyses of vaccine samples, and EMEM cell culture medium containing oseltamivir at a concentration of 10 mM for influenza virus analyses.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

2.3. Proteins immobilization

For immobilization purpose, proteins were used in a concentration of 200 μ g/mL in 10 mM sodium acetate buffer, pH = 4.5. Immobilization protocol was performed directly within the flow cell of the SPR-2 apparatus. Briefly, a surface activation solution composed of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS was applied at a flow rate of 25 μ L/min on the surface of a SPRi sensor for 4 min. Then, fetuin solution was injected for 4 min (25 μ L/min). In parallel, sensor reference surface (see Fig. 1B) was functionalized with control proteins, either BSA or truncated fetuin (without terminal sialic acid moiety). Remaining activated carboxylic acid functions of the sensor surface were then deactivated using 1 M ethanolamine injection for 3 min.

2.4. Protein surface density

According to the average density of proteins (i.e. $\rho_{prot} \approx 1.35 \times 10^{-21}$ g·nm^{−3}) the minimum volume of a globular protein can be calculated based on the following formula [23]:

$$V_{prot} [nm^3] = MW_{prot}/(\rho_{prot} \times N_A), \text{ where } N_A \text{ being Avogadro number.}$$

Thus, assuming fetuin can be modeled as a globular protein of 48.4 kDa, calculated V_{fetuin} is 59.5 nm³ and fetuin diameter 4.8 nm, leading to a maximum theoretical fetuin surface density

of 5.43×10^{10} molecules/mm². Similarly, assuming bovine serum albumin can be modeled as a globular protein of 66 kDa, calculated V_{BSA} is 81 nm³ and BSA diameter 5.3 nm, leading to a maximum theoretical BSA surface density of 4.42×10^{10} molecules/mm².

The mean SPRI signal obtained during fetuin and BSA immobilization were 1340 RU and 870 RU, respectively. The measured responses can be converted into protein surface density using the classical correspondence where 1 response unit (RU) corresponds to approximately 1 pg/mm² [24]. Therefore, surface densities of 1.66×10^{10} molecules/mm² and 7.9×10^9 molecules/mm² were calculated for fetuin and BSA, respectively.

2.5. SPRI assay

Running buffer for all experiments was composed of PBS containing 0.05% (v/v) of Tween 20. A constant running buffer flow rate of 25 µL/min was used during all experiments while temperature in the measurement chamber was maintained at 15 °C. Sample injection flow rate was fixed to 5 µL/min for 6 min. This low flow rate favors conditions of mass transport limitation (MTL) enabling the determination of initial binding rates (dR/dt), which are proportional to analyte concentration [25]. Regeneration of the biosensor surface was performed through the injection, at a flow rate of 25 µL/min, of 25 µL of PBS containing 0.25% (v/v) of SDS. The neuraminidase inhibitor oseltamivir carboxylate was added to all samples at a concentration of 10 µM, to prevent cleavage of sialic acid residues from the fetuin-functionalized sensor.

2.6. Preparation of split-inactivated virus from ovoculture

Pandemic Influenza viral strain NYMC X-179A (reassortant A/H1N1/California/07/2009, NIBSC 09/216) was used for the production of split-inactivated virus. A stock production of Triton-fragmented H1N1 influenza virus was realized by ovoculture on 11-day-old embryonated hen's eggs. Allantoic fluid was harvested 72 h post-infection, concentrated by ultracentrifugation (UC) and purified through 25–60% sucrose gradient UC. Visible virus band was collected and layered onto PBS buffer before a final UC. Pellets were re-suspended before virus fragmentation with 0.5% Triton-X100 detergent for 1 h at 37 °C and dialyzed against PBS. Removal of detergent was achieved thanks to Bio-beads SM2 resin. After beads removal, samples were inactivated with 0.01% formaldehyde for 72 h at 20 °C. This preparation was calibrated using SRID assay and constituted our reference samples. Split-inactivated virus stored at 2–8 °C remain stable for several months [26].

2.7. Preparation of influenza virus from cell culture

Cell-based production of influenza virus was performed using Madin–Darby Canine Kidney cells (MDCK Lonza, ATCC CCL34).

Cells were grown in T-flasks 175 cm² in serum-free Ultra-MDCK medium supplemented with L-glutamine and penicillin/streptomycin until reaching 70–80% confluence (approximately 10^5 cells/cm²). For infection, influenza viruses from H1N1 pandemic NYMC X-179A strain (reassortant A/H1N1/California/07/2009, NIBSC 09/216) were inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-4} virus/cell determined by TCID₅₀ assay (see next paragraph). Infection was performed in serum-free EMEM medium supplemented with L-glutamine, penicillin/streptomycin at a concentration of 100 U/mL and 1 µg/mL Trypsin. Virus production were harvested and clarified by 10 min low-speed centrifugation at 2000g before SPRI analyses. Control cell cultures were treated using identical protocol except for virus infection.

For the evaluation of viral production kinetics, cultures were sampled daily, clarified by 10 min low-speed centrifugation at 2000g and stored at –80 °C before analysis.

2.8. Titration of infectious viral particles (IVP)

Infectious titer (IVP/mL) of influenza virus particles were quantified by tissue culture infectious dose at 50% (TCID₅₀) and plaque forming units (PFU) assays. For PFU assay, confluent MDCK cells were plated in 6-well tissue culture plates, inoculated with 800 µL of cell culture supernatant serially diluted (1:10) in EMEM medium, and incubated 1 h at 37 °C under continuous shaking. Cells were washed with EMEM medium and overlaid with 1.1% Nobel agar previously mixed 1:1 with 2x MEM containing in addition 200 U/mL of penicillin-streptomycin and 2 µg/mL Trypsin. The plates were then incubated for 3 days at 37 °C, 5% CO₂ before visual examination of cytopathic effect. Infectious titer protocol was already described in Petiot et al. 2017 [12].

2.9. Quantification of total viral particles (VP)

Total particles were quantified by Tunable resistive pulse sensing technique (TRPS) using qNano Gold (IZON Science, Lyon, France). Analyses were performed using TPU membranes with a tunable nanopore of 150 nm (NP150). Prior analyses, samples were diluted at 1/5 in PBS buffer.

2.10. Quantification of hemagglutinin (HA) antigen content

HA concentration in split-inactivated lot of H1N1 virus has been determined by Single Radial Immunodiffusion assay (SRID) according to standard protocol with calibrated standard antigen (NIBSC 09/196) and polyclonal serum (NIBSC 14/134) of A/California/7/2009 [27]. Standard antigen and samples were incubated with a final concentration of 1% Zwittergent 3–14 for 30 min at room temperature, diluted at 1:1; 3:4; 1:2; 1:4 and loaded in triplicate into wells. Gels were incubated for 20 h at 22 °C to enable

Table 1

Detailed description of the reference samples used in the present study. * TIV: Trivalent Inactivated Vaccine Vaxigrip® 2016–2017 (lot #N2A381M). † HA content of influenza vaccine based on vaccine SRID titer provided by the manufacturer. ‡ HA content provided by NIBSC.

Technique	TIV Vaccine* Trivalent, purified, inactivated and fragmented virus	Split-inactivated H1N1 virus H1N1 X-179A produced by ovoculture, purified and fragmented	NIBSC influenza reference reagents 09/ 196 (H1N1) and 12/114 (H3N2) Partially purified, inactivated, freeze-dried virus	H1N1 virus H1N1 X-179A produced in MDCK cell culture
SRID [µg HA·mL ⁻¹]	90 [†]	239	37 (H1N1) [†] 79 (H3N2) [†]	N.A.
Neuraminidase assay [nmol 4-Me·h ⁻¹ ·mL ⁻¹]	900	3000	N.A.	80
Total Particles [particles·mL ⁻¹]	1.15×10^{11}	1.58×10^{12}	N.A.	1.71×10^{10}
Infectious titer [PFU·mL ⁻¹]	Non-infectious	Non-infectious	Non-infectious	4.5×10^7

antigen migration, then washed with PBS, dried and stained in Coomassie blue. Precipitating rings were measured using ProtoCol 3 (SYNBIOSIS), and HA content was determined in $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the parallel line bioassay method by comparison of obtained dose-response curves of the samples with those of the standard antigen.

3. Results and discussion

The present study aimed at developing and validating the use of a SPRI-based assay for the characterization and quantification of influenza virus and antigen production (egg or cell-based process). In order to fully validate the developed analytical system, various preparations (trivalent vaccine, monovalent split-inactivated and whole influenza viruses) have been used and characterized (HA antigen content by SRID, neuraminidase activity and total or infectious particles counting), as described in Table 1.

3.1. SPRI assay optimization

The main steps toward the development of an effective SPRI assay is the optimization of sensing and control layers, but also the study of the possible regeneration of these surfaces and their operational lifetime. The sensing layer chosen in the present study is a covalently immobilized fetuin glycoprotein bearing oligosaccharides with α -2,3- and α -2,6-linked terminal sialic acid residues [28]. Two different negative control layers were evaluated, one composed of immobilized albumin from bovine serum (BSA) and one composed of fetuin treated with bacterial neuraminidase allowing for cleavage of α -2,3, α -2,6 or α -2,8 terminal sialic acid

linkage. This second control surface corresponds to a cropped fetuin structure, close to the asialofetuin structure, known for inducing no specific binding of HA [29–31]. Both sensing and control surfaces are present in a single flow cell (Fig. 1A).

These three surfaces were prepared through the covalent grafting of each protein via amide bond formation between the gold chip surface modified with carboxylic acid groups (thioctic acid) and available primary amino groups of proteins. Fetuin grafting pH conditions were optimized to reach a maximal amount of sialic acid residues available for hemagglutinin binding. Indeed, protein grafting on the surface in flow conditions requires a contact between the surface and the protein, which is highly dependent upon the isoelectric point of the protein and then the pH of the immobilization solution. Optimum fetuin surface coverage of 1.66×10^{10} molecules/ mm^2 was found using a grafting pH of 4.5. This coverage compares well with the theoretical maximum coverage of 5.43×10^{10} molecules/ mm^2 calculated using protein size and comparing with immobilization SPRI signal (see Materials and methods for calculation).

Assay specificity was first assessed using monomeric recombinant HA (A/California/04/2009). No specific interaction was observed when the protein was injected through the biosensor (data not shown). Our results were in accordance with previous studies [2,18] and confirm the HA binding to sialic acid residues requires bioactive trimeric form of antigen [30,32], thus validating our fetuin-based SPRI assay that aims to detect functional hemagglutinin. In this context, commercial Trivalent Inactivated Vaccine (TIV, Vaxigrip® 2016–2017, presented in Table 1) was used as a calibrated standard for bioactive HA antigen to determine the performances of the SPRI assay.

Fig. 1B depicted the biosensor responses when TIV vaccine ($10 \mu\text{g HA}/\text{mL}$) interacted with the different surfaces. BSA control surface was not able to hinder the non-specific interactions with the injected sample, leading to a poor specific to non-specific signal ratio of 6.4. On the contrary, cropped fetuin surface was shown to be a more reliable control surface, leading to a non-specific signal ratio of 41. Moreover, we here confirmed our fetuin-based SPRI assay is particularly suited for the evaluation of vaccine potency as the response is specifically based on hemagglutinin interactions with sialic acid-terminated glycans.

Regeneration solution composition was also optimized to achieve a complete releasing, between each sequential injection, of the glycan-bound HA. Classically proposed regeneration solutions [33] such as glycine 0.1 M, HCl 10 mM or 100 mM, NaCl 1 M and 0.25% (v/v) SDS in PBS were then evaluated. The best results were obtained using injection of $25 \mu\text{L}$ of a regeneration solution composed of 0.25% (v/v) SDS in PBS (Supplementary Information 1). Example of the signal recovery is presented in Fig. 2A where SPRI baseline was recovered between each of 5 successive injections of TIV vaccine antigen ($10 \mu\text{g HA}/\text{mL}$).

Assay lifetime was also assessed through 20 successive cycles of TIV vaccine antigen ($10 \mu\text{g HA}/\text{mL}$) injection and consecutive regeneration. As depicted in Fig. 2B, a linear decrease of the biosensor response was observed (slope = $-9.7 \text{ RU}/\text{injection}$; $R^2 = 0.87$). This decrease was attributed to a surface degradation during regeneration rather than to a sialic acid cleavage by influenza neuraminidase, as the neuraminidase inhibitor oseltamivir carboxylate was systematically added to each sample. A correction factor was then applied to all subsequent experiments, adjusting the measured biosensor response with the calculated decrease slope.

Finally, reproducibility of the assay was evaluated (Fig. 2C). The relative standard deviation (RSD) of the response was calculated based on 7 consecutive injections of TIV vaccine antigen ($10 \mu\text{g HA}/\text{mL}$) and regeneration. The high reproducibility of our assay was then demonstrated with RSD of 3% and 1.3% calculated based on initial binding rate and response level, respectively.

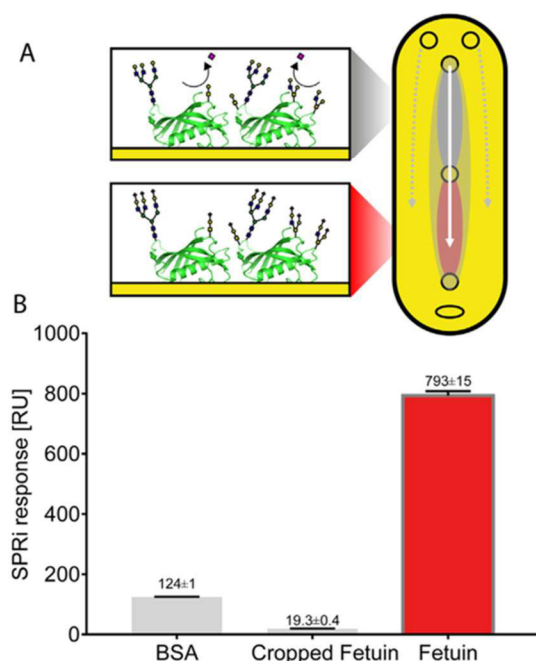


Fig. 1. Control and sensing SPRI surfaces. A: Schematic representation of the two distinct measurement zones of the SPRI biosensor flow cell: control (grey) and sensing (red) layers; white arrow: analyte flow; grey arrows: buffer flow. Glycan structures were added on fetuin (PDB 3APX) according to published data [28]. Terminal sialic acid moieties (purple diamond) are removed by bacterial neuraminidase (NA) in-situ before processing samples. B: SPRI response obtained for the control and sensing surfaces with TIV vaccine ($10 \mu\text{g HA}/\text{mL}$, $n = 3$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

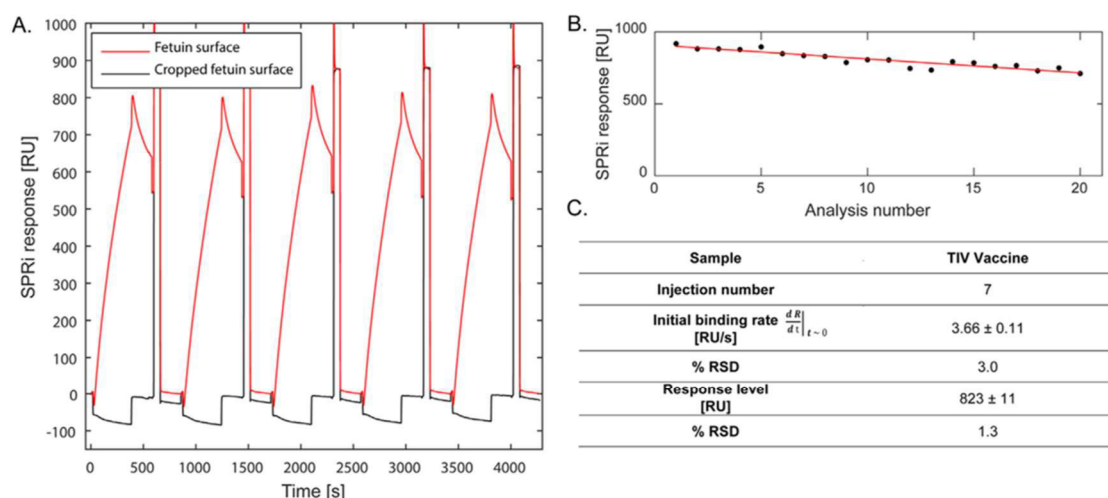


Fig. 2. Evaluation of sensor stability and assay reproducibility. A: Biosensor raw data obtained following 5 consecutive injections of TIV vaccine antigen ($10 \mu\text{g HA/mL}$) with consecutive regeneration. B: Operational stability of the fetuin sensing layer toward multiple regenerations using 0.25% (v/v) SDS in PBS. C: Reproducibility of the biosensor signal following several injections of TIV vaccine antigen samples ($10 \mu\text{g HA/mL}$, $n = 7$).

As a comparison, relative standard deviation of the classic SRID assay for influenza HA quantification is at best 6%, while the average RSD of Vaxarray sandwich immunoassay system has been estimated to 8% [2,6]. The RSD obtained are also in accordance with a previous study proposing SPR-based assay for influenza antigen quantification (2–5% for antibody-based SPR) [21]. Thus, after having validated the specificity of our regenerable sensor toward HA antigen and its excellent reproducibility, we further evaluated its sensitivity and applicability for sensing hemagglutinin present in different bioprocess-derived samples.

3.2. SPRi assay performances

To evaluate the sensitivity of our assay toward influenza hemagglutinin antigen, SPRi signals acquired following the injection of different concentrations of TIV commercial vaccine were used to build calibration curves (Fig. 3A). Linear dynamic range of the assay together with its limit of detection and limit of quantification are presented in Fig. 3C. These parameters were determined using both the initial binding rate (RU/s) and the biosensor response (RU). Linearity of the response was shown to be optimum when the analytical parameter used to build the calibration curve was the initial binding rate. Indeed, linear regression parameters of $R^2 = 0.999$ and $R^2 = 0.98$ were calculated for initial binding rate and response, respectively. The assay was also shown to offer a large dynamic range with a linear response within three orders of magnitude, between 0.03 and $20 \mu\text{g HA/mL}$. These results shall be compared to the dynamic range commonly obtained for SRID assay, i.e. between 3 and $36 \mu\text{g HA/mL}$ [34], demonstrating the superiority of the presently developed fetuin-based SPRi which offers 100 times higher sensitivity. Our SPRi assay also reveals to be superior to other alternative quantification methods proposed in the last decade as it presents much lower sensitivity with still a broad analytical range allowing for quantification of various types of samples ($3.4\text{--}44 \mu\text{g HA/mL}$ for latex agglutination assay [8]; $1\text{--}15 \mu\text{g HA/mL}$ for antibody-based SPR assay [4]; $0.5\text{--}45 \mu\text{g HA/mL}$ for biolayer interferometry (BLI) [18]). The sole study achieving similar sensitivity and linear range than the one presented in this work used a biotinylated receptor homolog to quantify pandemic HA between 0.33 and $30 \mu\text{g HA/mL}$ [4].

The assay performances were further evaluated by comparing the response obtained for different formulations of HA produced in egg: (i) TIV vaccine commercial formulation, equally composed of antigens from H1N1, H3N2 and B strains [35], and (ii) a split-inactivated partially purified H1N1 influenza virus. This comparison enable us to evaluate the impact of both antigen formulation valence (monovalent or multivalent) and purity on the association and dissociation kinetics of the sensor surface.

Sensorgrams and corresponding association and dissociation constants calculated using 1:2 association-dissociation model (global fitting in kinetic-limited conditions) are given in [Supplementary Information 2](#). TIV vaccine interaction with the immobilized fetuin evidenced higher dissociation constants than the freshly split H1N1 virus sample. This affinity decrease has previously been documented and characterized, and was attributed mainly to differences in quaternary structures between HA antigens and in the degree of chemical modifications between reference reagents and vaccine samples [2,6]. Thus, the present assay also has the potentiality to characterize vaccine virus production and a complementary study was performed about the interaction of H1N1 and H3N2 viruses with the present biosensor. NIBSC reference reagents (Table 1) for H1N1 and H3N2 strains were injected and the corresponding signals recorded. Results are presented in Fig. 3B. One more time, the biosensor was able to characterize interactions between immobilized fetuin and HA from two other different strains with clear variations in kinetic behaviors.

3.3. SPRi analysis of cell culture-derived influenza virus samples

The secondary objective of the study was to demonstrate the potential of SPRi fetuin-based assay to quantify virus particles production level in cell culture crude samples. It was therefore mandatory to properly distinct between specific binding and non-specific adsorption of cell culture derived impurities on sensor's surface [36]. Indeed, cell culture crude samples contain various components which might interfere with the SPRi surface, i.e. the biological product of interest (viral particles in our case), cells and debris that shall be removed during the clarification step, and a variety of either process- or product-related impurities. It was then necessary to investigate the effect of cell culture media and cell

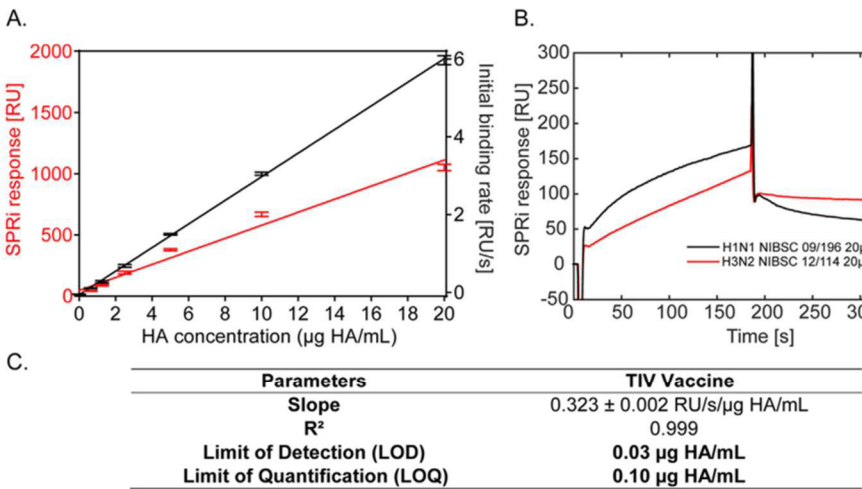


Fig. 3. Evaluation of SPRI assay performances with TIV vaccine and NIBSC reference reagents. A: Calibration curves for TIV vaccine ($n = 3$). B: Sensorgrams obtained for the analysis of H1N1 and H3N2 reference reagents. C: Analytical parameters determined for TIV vaccine based on initial binding rate determination, $\sigma_{\text{BLANK}} = 0.003$ RU/s ($n_{\text{BLANK}} = 3$).

culture-derived impurities on the response of our fetuin-functionalized surface.

A limited number of mammalian cell platform are currently in use for large-scale influenza virus production in the literature. Among them, MDCK cell line is the sole cellular platform currently in use for commercial vaccine manufacturing (Flucelvax[®], Sequirus). Thus, first part of this evaluation consisted in injecting selected fresh culture media (EMEM, Ultra-MDCK, Optipro and SFM4TransFX) onto the fetuin-functionalized surface. These media were chosen for their use in reference cell-based influenza virus production described in the literature [37,38]. From this study, only SFM4TransFX demonstrated a strong non-specific response (Supplementary Information 3, Fig. S3-left) excluding it from the list of potential media useful for SPRI detection of cell culture product. Then, upon the selected media giving only negligible SPRI non-specific response (below 5 RUs), EMEM documented as a suitable media for the production of influenza virus using MDCK cells, was then selected for all subsequent experiments.

Then, the effect of the MDCK side-products was evaluated through the injection of clarified samples from non-infected MDCK cell cultures in EMEM medium. As can be seen in Supplementary Information 3, Fig. S3-right, even if a clear increase of the non-specific signal was observed (from 1.4 to 5 RUs), this signal was still found to be negligible and permitted to validate the use of MDCK culture in EMEM medium for potential SPRI detection of influenza virus during bioprocess.

These preliminary measurements being performed, the SPRI assay was used to evaluate virus concentration in samples from cell-based bioprocesses. H1N1 virus samples harvested at 48 h post-infection (hpi) were quantified on both SPRI sensor and reference assays, namely infectivity assay (PFU) and total particles counting (TRPS). The 48hpi sample was used to build calibration curve and to evaluate biosensor performances and linearity of the response for total influenza virus particles (Fig. 4). As detailed in Fig. 4B, the SPRI assay offered a limit of detection of 1.8×10^5 PFU/mL and a limit of quantification of 5.3×10^5 PFU/mL. The linear response was confirmed among a 2-log analytical range, allowing to reach 10^7 PFU/mL. Considering standard production kinetics obtained for cell-based influenza productions, such results allow to envision the in-process monitoring of influenza production in

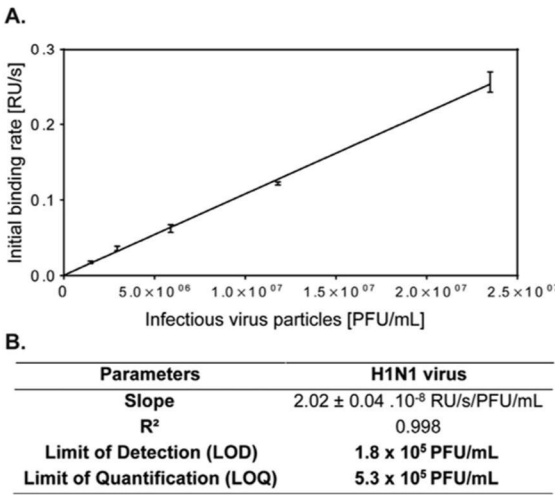


Fig. 4. Evaluation of SPRI assay performances with cell culture-derived influenza virus. A: Calibration curve for H1N1 virus produced in MDCK cell culture (harvest time: 48 h.p.i.) according to infectious viral particles ($n = 2$). B : Analytical parameters determined for H1N1 virus based on initial binding rate determination, $\sigma_{\text{BLANK}} = 0.001$ RU/s ($n_{\text{BLANK}} = 3$).

cell-based bioprocess from its early production phases up to its maximal production level.

Notably, one must here take into account the discrepancy between the mechanisms involved in plaque forming units (PFU) determination and the present biosensor. Indeed, PFU assay is only impacted by the presence of infectious viral particles, whereas our fetuin-based assay quantifies both infectious and non-infectious viral particles as long as they harbor bioactive HA. In our case, from the sample harvested at 48 h post-infection, PFU and TRPS quantification allowed to calculate a VP/IVP ratio of 380 (Supplementary Information 4). It is then clear that the SPRI biosensor signal obtained shall be considered only as an indirect detection of IVP (or PFU) through the detection of the total VP concentration. Indeed, only 1/380 of the observed interactions are induced by

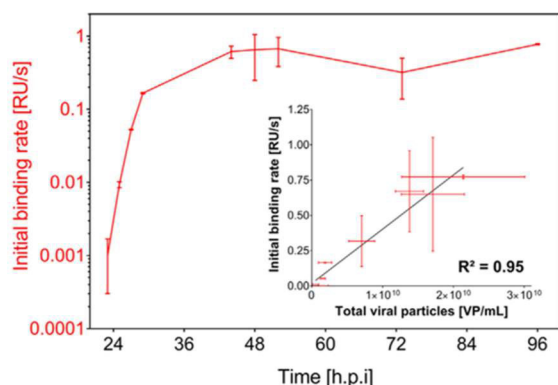


Fig. 5. Influenza virus production kinetics determined by SPRI in MDCK cell culture-based bioprocess from 23 to 96 h post-infection. Insert: correlation between SPRI biosensor response and total viral particles concentration determined by TRPS ($n = 3$ for SPRI analysis and $n = 2$ for TRPS analysis).

IVP presence and these interactions correspond to SPRI signals near the apparatus' detection limit (0.1 RU). Additionally, in terms of total viral particles the limit of detection was 6.5×10^7 VP/mL, which makes SPRI as sensitive as other (e.g. NTA) quantification techniques used for total viral particles analysis [17].

3.4. SPRI at-line monitoring of influenza virus production kinetics

VP titer is one of the main parameter of interest regarding viral vaccine production, as one ultimately wants to evaluate total antigen content in the production process. Indeed, the last set of experiments herein documented is an attempt to demonstrate the potential of the SPRI assay for its later on-line implementation for monitoring of virus particle production. H1N1-infected and mock-infected cell cultures were harvested at regular intervals from 23 to 96 h post-infection. Collected samples were further clarified and injected undiluted onto the fetuin-based biosensor ("at-line" [22]). For the sake of comparison, all samples were also quantified by reference infectivity assay (PFU) and total particles counting (TRPS). The experimental results are presented in Fig. 5, where each point corresponds to the net SPRI response between infected and control culture. As can be seen, a clear evolution of the biosensor signal was obtained with a SPRI response that levels off at 40 h post-infection. This stabilization of the total virus particle content was also observed using TRPS measurements (Supplementary Information 4). Fig. 5-insert presents the correlation between the measured SPRI signals and the TRPS measurements. A linear correlation ($R^2 = 0.95$) was found between the two techniques, proof of the usefulness of the developed technique for cell-based vaccine production monitoring.

4. Discussion

We here presented an assay for the rapid and label-free quantification of influenza virus particles and bioactive hemagglutinin in bioprocess-derived samples, i.e. egg-based and cell-based bioprocesses. The method is based on affinity capture of hemagglutinin antigen by sialic-acid terminated glycans present at the surface of the fetuin-functionalized sensor, which addresses the challenge of producing updated strain-specific sera or antibody reagents required for SRID. Sensor regeneration strategy allows for running multiple sequential analysis on the same sensor, while the use of fetuin glycoprotein provides a panel of sialylated α -2,3 and α -2,6 glycans offering specific ligands for influenza HA

quantification without discriminating between influenza strains. The assay was shown to offer better analytical performances than SRID or other assays recently developed for influenza vaccine potency evaluation and requires low analyte volume ($<100 \mu\text{L}$). The high sensitivity and wide analytical range (0.03 – $20 \mu\text{g HA/mL}$) provide the possibility to evaluate bioprocess samples with low HA titers. Sample time processing was 10 min while SRID turnaround time is usually 2–3 days [4].

The assay was also shown to have the potentiality to be directly applied to cell-based bioprocess monitoring. Several cell culture media showed that they induced no non-specific binding, which opens the way to work with different cell lines. Also, a minimum sample pretreatment (cell/supernatant separation through 2000 g centrifugation) was required before analysis, which might in a near future be implemented on-line using membrane and/or acoustic filtration for sample pretreatment [39]. This SPRI quantitative assay reveals a highly valuable process analytical technology (PAT) approach as it opens the path to the evaluation of influenza vaccine production consistency and robustness with the quantification of total virus particles along the production and purification processes. It is also a technology potentially allowing the evaluation of HA antigen total particles content of new cell culture-based influenza vaccine under development (e.g. Virus-like Particles vaccine). Indeed, such processes generally offer lower productivity regarding upstream process step.

Declaration of interests

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgement and financial & competing interest disclosure

L. Durous acknowledges the Auvergne Rhône-Alpes Region for his PhD grant (ARC 1 Santé). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.083>.

References

- [1] Minor P. Assaying the potency of influenza vaccines. *Vaccines* 2015;3:90–104. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010090>.
- [2] Khurana S, King LR, Manischewitz J, Coyle EM, Golding H. Novel antibody-independent receptor-binding SPR-based assay for rapid measurement of influenza vaccine potency. *Vaccine* 2014;32:2188–97. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.049>.
- [3] EMA/EDQM. Joint EMA/EDQM workshop on improved potency assays for inactivated influenza vaccines. meeting report 12 Dec 2011; 2012.
- [4] Thompson CM, Petiot E, Lennaert A, Henry O, Kamen AA. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology* 2013;10:141. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-141>.
- [5] WHO Global Influenza Programme. Influenza Vaccine Response during the Start of a Pandemic. Geneva, Switzerland; 2015.
- [6] Kuck LR, Saye S, Loob S, Roth-Eichhorn S, Byrne-Nash R, Rowlen KL. VaxArray assessment of influenza split vaccine potency and stability. *Vaccine* 2017;35:1918–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.028>.
- [7] Bodle J, Verity EE, Ong C, Vandenberg K, Shaw R, Barr IG, et al. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantitation of influenza haemagglutinin: an alternative method to single radial immunodiffusion. *Influenza Other Respir Viruses* 2013;7:191–200. <https://doi.org/10.1111/irv.1250-2659.2012.00375.x>.
- [8] Buffin S, Ikhelef N, Prudent J, Dubayle J, Nougarede N, Varenne MP, et al. A latex agglutination assay to quantify the amount of hemagglutinin protein in

- adjuvanted low-dose influenza monovalent vaccines. *J Virol Methods* 2018;251:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.011>.
- [9] Pierce CL, Williams TL, Moura H, Pirkle JL, Cox NJ, Stevens J, et al. Quantification of immunoreactive viral influenza proteins by immunoaffinity capture and isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2011;83:4729–37. <https://doi.org/10.1021/ja2006526>.
- [10] Wen Y, Han L, Palladino G, Ferrari A, Xie Y, Carfi A, et al. Conformationally selective biophysical assay for influenza vaccine potency determination. *Vaccine* 2015;33:5342–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.077>.
- [11] Petiot E, Kamen A. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures. *Biotechnol Prog* 2013;29:275–84. <https://doi.org/10.1002/btpr.1601>.
- [12] Petiot E, Proust A, Traversier A, Durous L, Dappozze F, Gras M, et al. Influenza viruses production: evaluation of a novel avian cell line DuckCelt®-T17. *Vaccine* 2018;36(22):3101–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.102>.
- [13] Genzel Y, Dietzsch C, Rapp E, Schwarzer J, Reichl U. MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88:461–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2742-9>.
- [14] Brown SW, Mehtali M, Sci PD, et al. The Avian EB66® Cell Line, Application to Vaccines, and Therapeutic Protein Production The Avian EB66® Cell Line, Application to Vaccines, and Therapeutic Protein Production; 2010.
- [15] Frensing T. Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors. *Biotechnol J* 2015;10:681–9. <https://doi.org/10.1002/biot.201400429>.
- [16] Frensing T, Heldt FS, Pflugmacher A, Behrendt I, Jordan I, Flockerzi D, et al. Continuous influenza virus production in cell culture shows a periodic accumulation of defective interfering particles. *PLoS ONE* 2013;8:e72288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072288>.
- [17] Heider S, Metzner C. Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology* 2014;462–463:199–206. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.005>.
- [18] Carvalho SB, Moleirinho MG, Wheatley D, Welsh J, Gantier R, Alves PM, et al. Universal label-free in-process quantification of influenza virus-like particles. *Biotechnol J* 2017;12:1–24. <https://doi.org/10.1002/biot.201700031>.
- [19] Chavane N, Jacquemart R, Hoemann CD, Jolicoeur M, De Crescenzo G. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Anal Biochem* 2008;378:158–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.04.019>.
- [20] Jacquemart R, Chavane N, Durocher Y, Hoemann C, De Crescenzo G, Jolicoeur M. At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnol Bioeng* 2008;100:184–8. <https://doi.org/10.1002/bit.21725>.
- [21] Nilsson CE, Abbas S, Bennemo M, Larsson a, Hämäläinen MD, Frostell-Karlsson A. A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance. *Vaccine* 2010;28:759–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.070>.
- [22] Whitford W, Julien C. Analytical technology and PAT. *Bioprocess Int* 2007;5: S32–41.
- [23] Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online* 2009;11:32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.
- [24] Schasfoort RBM. Chapter 3. Surface plasmon resonance instruments, handbook of surface plasmon resonance. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2017. p. 60–105. <https://www.doi.org/10.1039/9781788010283-00060>.
- [25] Karlsson R. Biosensor binding data and its applicability to the determination of active concentration. *Biophys Rev* 2016;8:347–58. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0219-5>.
- [26] 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;11:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150700>.
- [27] 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. *J Biol Stand* 1977;5:237–47.
- [28] Gerlach JQ, Kilcoyne M, Joshi L. Microarray evaluation of the effects of lectin and glycoprotein orientation and data filtering on glycoform discrimination. *Anal Methods* 2014;6:440–9. <https://doi.org/10.1039/c3ay40936h>.
- [29] Jiang L, Eichelberger MC. Evaluation of Epic® label-free technology to quantify functional recombinant hemagglutinin. *Biol Proced Online* 2015;17:7. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0019-5>.
- [30] Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, et al. Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus. *PLoS ONE* 2010;5:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011548>.
- [31] Takemoto DK, Skehel JJ, Wiley DC. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology* 1996;217:452–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0139>.
- [32] Magadán JG, Khurana S, Das SR, Frank GM, Stevens J, Golding H, et al. Influenza A virus hemagglutinin trimerization completes monomer folding and antigenicity. *J Virol* 2013;87:9742–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.00471-13>.
- [33] GE Healthcare. Biacore Sensor Surface Handbook; 2005.
- [34] Kuck LR, Sorensen M, Matthews E, Srivastava I, Cox MMJ, Rowlen KL. Titer on chip: new analytical tool for influenza vaccine potency determination. *PLoS ONE* 2014;9:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109616>.
- [35] Council of Europe. Influenza vaccine (SPLIT VIRION, INACTIVATED). *Eur Pharmacopoeia* 2008:867–8.
- [36] Masson JF, Battaglia TM, Cramer J, Beaudoin S, Sierks M, Booksh KS. Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:1951–9. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0834-2>.
- [37] Lohr V, Rath a, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: studies on growth, metabolism and virus propagation. *Vaccine* 2009;27:4975–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.083>.
- [38] Milián E, Kamen Aa. Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza. *Vaccines* 2015 2015.
- [39] Genzel Y, Vogel T, Buck J, Behrendt I, Ramirez DV, Schiedner G, et al. High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells. *Vaccine* 2014;32:2770–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.016>.

VI.3. Résultats complémentaires, conclusions et perspectives

Dans cette partie sont exposées les données supplémentaires de cette publication, de manière détaillée et commentée. De plus, les conclusions et perspectives apportées par ces travaux initiaux sont détaillés selon différents aspects (ligand, conditions d'analyse, traitement du signal, performances analytiques, évaluation des paramètres cinétiques).

VI.3.1. Le choix du ligand utilisé

Nous avons choisi d'utiliser une glycoprotéine sialylée comme ligand. La fétuine A (également appelée glycoprotéine α 2-HS) est une glycoprotéine présentant une densité d'acides sialiques élevée ($\sim 9\%$ m/m (215)) et donc intéressante afin de réaliser une surface présentant une forte densité de ligand (216). Nous avons également validé que la densité de surface de fétuine obtenue après immobilisation était proche de la densité surfacique attendue pour une monocouche homogène ($\sim 5 \cdot 10^{10}$ mm⁻², voir **2.4**). Récemment, Guo et al. ont utilisé des glycoprotéines présentant différents types de glycosylation (N- et O-glycosylées) pour évaluer le mécanisme d'association du virus Influenza sur une plateforme d'interférométrie (Octet *BioLayerInterferometry* – BLI) (168).

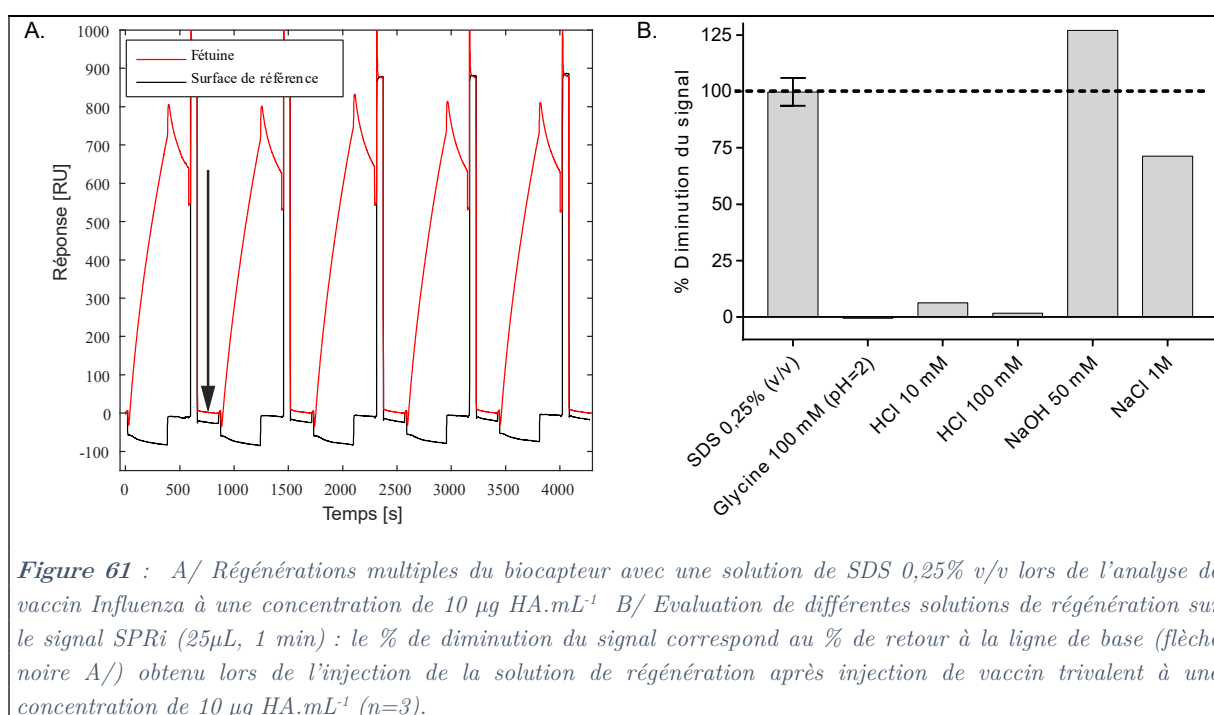
D'autres ligands ont pu être évalués tels que des glycanes mono- et multivalents (voir **Chapitre VII**) et les sérums de référence utilisés en SRID. Cependant, les glycanes multivalent n'offrent pas de meilleures performances analytiques que la fétuine (voir **Chapitre VII**) qui permet d'obtenir une surface avec une densité d'acide sialiques élevée (voir **Chapitre VIII**). L'emploi des sérums de référence du test SRID pour le développement d'un test SPR quantitatif a précédemment été évalué par Nilsson et al. qui ont développé un test quantitatif indirect (102). Cette stratégie nous est apparue peu intéressante car elle nécessite les mêmes réactifs souche-spécifique que pour la SRID. Par ailleurs, ces sérums sont fournis dans un tampon PBS-BSA 1% qui ne permet pas une immobilisation avec une densité élevée sur le capteur SPRi sans une étape de purification préparative. Comme il a été vu dans le **chapitre II**, les anticorps universels ciblant la HA reconnaissent le peptide de liaison exposé en conditions dénaturantes (tampon urée 6M) (96), ce qui les rend peu exploitables pour la réalisation d'analyse SPR. Par ailleurs ils ne permettent pas de quantifier la HA sous sa forme active.

Concernant le choix de la surface de référence : la réalisation d'une surface de référence par lyse enzymatique de la fétuine immobilisée nous est apparue particulièrement intéressante puisque la surface possède ainsi des caractéristiques identiques à la surface d'analyse, hormis la présence de groupements acides sialiques terminaux. Le signal non-spécifique élevé obtenu lors de l'évaluation de la surface de référence après immobilisation de BSA peut être attribué à un manque de couverture de la surface par la BSA lors de la phase d'immobilisation entraînant des interactions

non spécifiques entre l'échantillon de vaccin et la surface d'or fonctionnalisée (lors de la réalisation de biopuces multiplexées, la BSA immobilisée après dépôt sans contact offrait un signal non spécifique nul, voir **Chapitre VII**). Par ailleurs l'utilisation d'asialofétuine à la place de la fétuine traitée par la neuraminidase bactérienne est envisageable, puisque l'asialofétuine diffère de la fétuine A au niveau de sa glycosylation et ne possède pas de glycanes avec une extrémité terminale acide sialique (217,218).

VI.4. Les conditions d'analyse

La régénération du capteur est indispensable à la réalisation de cycles d'analyse multiples et constitue souvent une étape limitante lors du développement de tests analytiques basés sur la SPR (147). La **Figure 61** détaille l'évaluation de différentes solutions pour la régénération du capteur par l'évaluation du pourcentage de retour à la ligne de base du signal SPRi après injection de la solution de régénération.



Nous avons pu établir que l'injection de dodécylsulfate de sodium (SDS, 0,25% v/v en PBS-T, 1 min) offrait une régénération totale de la surface avec un retour à la ligne de base en maintenant l'activité du ligand. Par ailleurs, les analyses ont été réalisées avec un temps d'analyse de 360 s. On remarque que ces conditions ne permettent pas d'atteindre un état d'équilibre. Cependant, les analyses quantitatives basées sur l'évaluation du taux d'association

initiale (*initial binding rate*) peuvent être réalisés avec un temps d'analyse court (<1 min) en offrant une reproductibilité semblable à celle d'une analyse en point final et une gamme analytique linéaire élargie (voir **Fig. 2** et **Fig. 3A de l'article publié**).

Lors des analyses, il a été choisi d'ajouter un inhibiteur de la neuraminidase virale (carboxylate d'oseltamivir (OC), 10 μ M) afin d'inhiber la lyse des acides sialiques à la surface du biocapteur pouvant entraîner : a) la dissociation des virus influenza lié en surface du capteur/l'augmentation du k_d apparent des particules virales, b) une perte d'activité de la surface au cours des cycles d'analyse. En effet, les différents échantillons de référence analysés présentaient une activité neuraminidase (voir publication : **Table 1**). L'effet de l'ajout d'un inhibiteur de neuraminidase sur la réponse SPRi a été évalué sur un échantillon de virus H1N1 (voir **Figure 62**) par le calcul du taux d'association initiale. On observe que les coefficients de transfert de masse k_t (**Figure 62B**, voir publication et partie **VI.5**) évalués ne diffèrent pas significativement en présence/absence d'OC. Cette observation infirme les résultats de Guo et al. qui décrivent un taux d'association légèrement supérieur en absence vs présence d'OC pour certains virus (168)⁵.

Avec ajout d'OC, le signal SPRi reste stable durant la phase de dissociation, ce qui confirme que la multivalence des interactions HA-glycanes entraîne une liaison d'affinité apparente élevée et une absence de dissociation des particules virales à la surface du capteur (rejoignant ici Guo et al. (168)). Il faut noter que le K_d apparent n'est pas quantifiable par les analyses SPRi réalisées ici et que cela nécessiterait des analyses permettant d'atteindre un état d'équilibre à défaut de présenter une cinétique de dissociation modélisable (voir **Chapitre III**).

En conclusion, l'ajout d'OC semble indispensable à la réalisation d'analyses SPRi quantitatives multiples afin de limiter la perte d'activité du capteur lié à la diminution de la densité surfacique de ligand (paramètre influençant les conditions de limitation par le transfert de masse) par l'activité catalytique de NA. Par ailleurs, le taux d'association initiale mesuré ne semble pas influencé par l'inhibition de la NA.

⁵ Pour ces travaux, les auteurs modélisent cependant l'association sur des temps de 15-60 min pour lesquels le taux d'association n'est plus uniquement proportionnel à la concentration en particules virales mais également à d'autres paramètres (activité NA, densité de ligand).

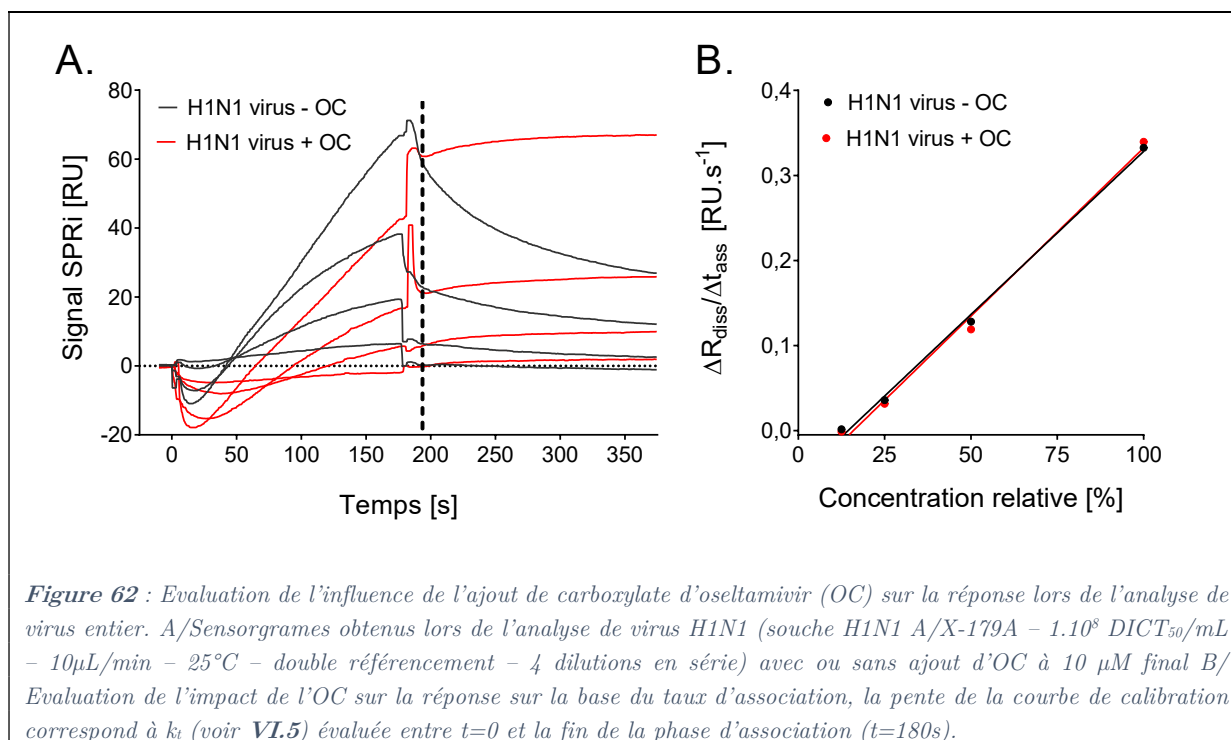
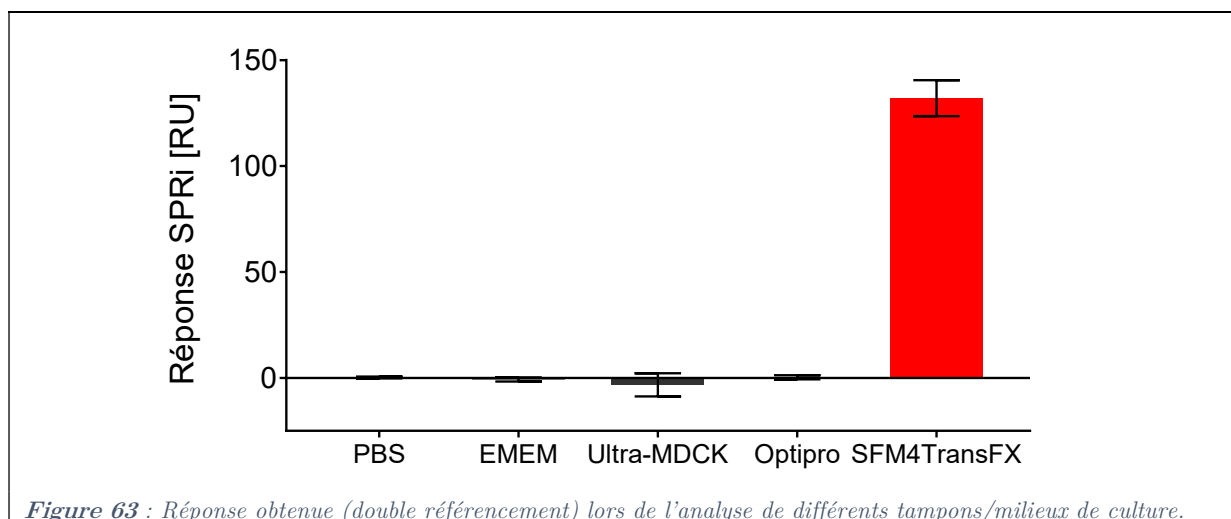


Figure 62 : Evaluation de l'influence de l'ajout de carboxylate d'oseltamivir (OC) sur la réponse lors de l'analyse de virus entier. A/Sensorgrammes obtenus lors de l'analyse de virus H1N1 (souche H1N1 A/X-179A – 1.10^8 DICT₅₀/mL – $10\mu\text{L}/\text{min}$ – 25°C – double référencement – 4 dilutions en série) avec ou sans ajout d'OC à $10\mu\text{M}$ final B/ Evaluation de l'impact de l'OC sur la réponse sur la base du taux d'association, la pente de la courbe de calibration correspond à k_a (voir VI.5) évaluée entre $t=0$ et la fin de la phase d'association ($t=180\text{s}$).

VI.5. Le traitement du signal SPRi

VI.5.1. Evaluation du signal non-spécifique

La chimie de surface des capteurs SPRi utilisée pour l'immobilisation de ligand (monocouche exposant des groupements acide carboxylique permettant une immobilisation de ligand par greffage EDC/NHS) semble avantageuse pour la réalisation de tests SPRi quantitatifs et particulièrement dans le cas d'analyte de très haut poids moléculaire tel que des particules virales ($\text{PM} \sim 10^6$ Da) (149,197). Cependant, l'absence de matrice tridimensionnelle en surface du capteur (exemple : matrice de Dextran) ne permet pas de limiter les interactions non-spécifiques entre les contaminants éventuels du surnageant de culture et la surface du biocapteur. Nous avons initialement cherché à évaluer le signal non-spécifique potentiellement induit par les composants du milieu de culture (voir **Figure 63**). Nous avons pu observer que certains milieux (SFM4TransFx) entraînaient un signal non spécifique élevé, probablement dû à la présence de composés de nature protéique dans leur composition. Par ailleurs, nous avons validé que le milieu utilisé pour les infections en culture MDCK (EMEM) n'entraînait pas de signal non-spécifique.



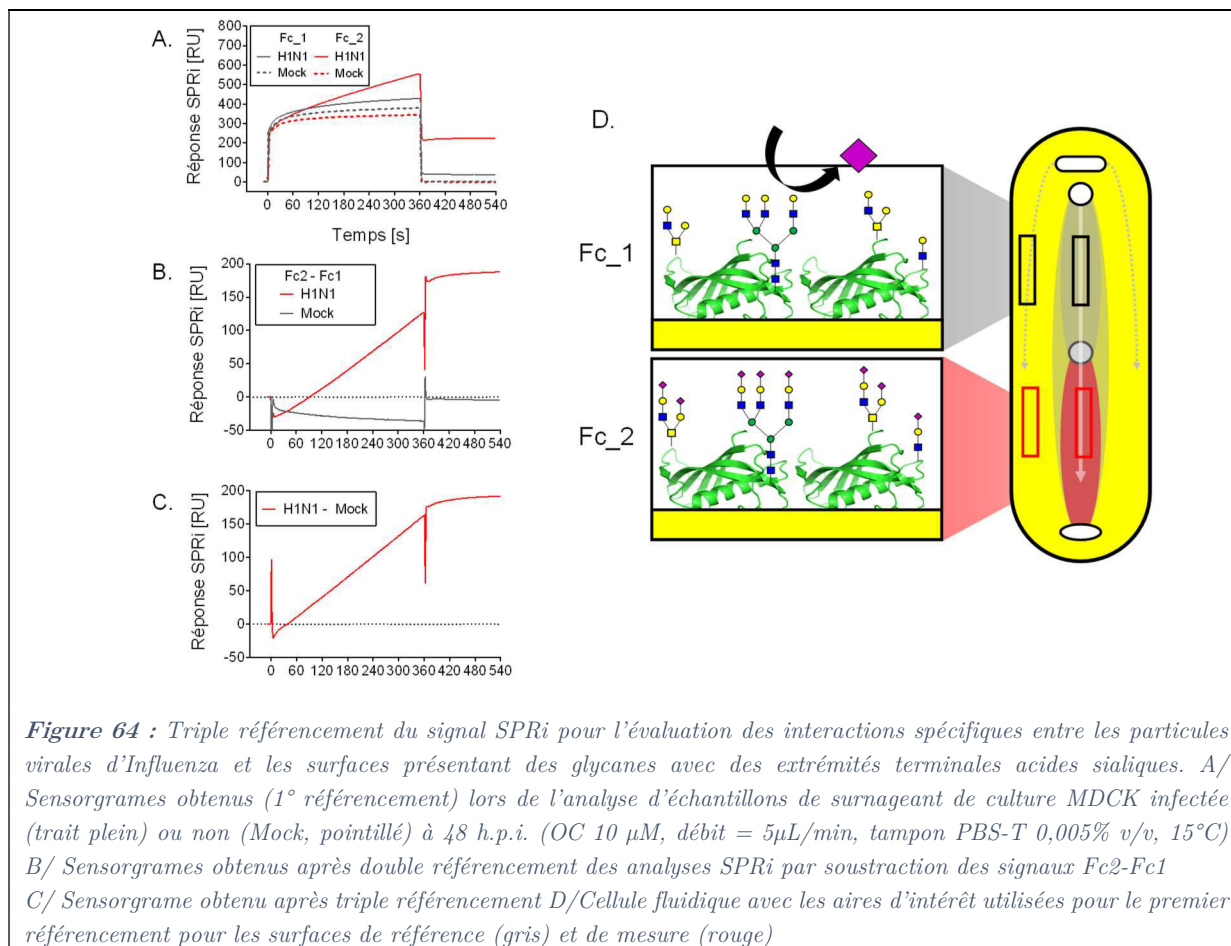
VI.5.2. Référencement des sensorgrames et détermination du k_t

Afin de valider que les sensorgrames obtenus indiquaient des conditions de limitation par le transfert de masse, un triple référencement de la réponse a été réalisé lors de l'analyse des productions virales réalisées en culture MDCK (voir **Figure 64**) :

- **1° référencement** : pour chacune des surfaces (mesure et référence), soustraction du signal obtenu pour la surface par le signal d'une aire d'intérêt au niveau de laquelle circule uniquement le tampon.
- **2° référencement** : soustraction du signal SPRi de la surface de mesure (fétuine) par le signal SPRi de la surface de référence (fétuine dé-sialylée).
- **3° référencement** : soustraction du signal SPRi obtenu lors de l'analyse de productions virales en cellules MDCK par le signal obtenu lors de l'analyse de surnageant de culture non infectée (« mock ») prélevé au même temps de culture.

D'après la **Figure 64A**, on observe la présence d'un signal non-spécifique durant la phase d'association lors de l'analyse de surnageants de culture non infectée. Cependant le signal non-spécifique est quasi-nul lors de la phase de dissociation (voir **Figure 63**). Le profil des sensorgrames obtenus après triple référencement (**Figure 64C**) nous a permis de valider que l'analyse de particules virales par SPRi, dans les conditions évaluées entraînait un signal indiquant une limitation par le transfert de masse : le signal est linéaire (sans épaulement) durant toute la durée de la phase d'association évaluée ($\Delta t_{\text{ass}} = 360\text{s}$). Ces observations sont en accord avec d'autres publications qui évaluent que l'état d'équilibre lors de l'analyse de l'interaction de particules virales entières avec des surfaces présentant des glycanes est atteint pour une durée

de l'ordre de grandeur de $\sim 1h$ (et pour des concentrations en particules virales de l'ordre de 10^9 particule.mL⁻¹) (168,172). Le profil des sensorgrames est également similaire à celui d'autres tests SPR quantitatifs précédemment développés (197,200,201).



Ces conditions permettent d'évaluer la réponse SPRi obtenue par la détermination du taux d'association initiale par régression linéaire sur la partie initiale (30s) ou sur toute la durée de la phase d'association avec des coefficients de régression $R^2 > 0,99$. Par ailleurs, puisque le virus ne présente pas de dissociation mesurable dans l'intervalle de temps de la phase de dissociation (180s) et que la réponse non-spécifique évaluée durant la phase de dissociation pour des échantillons de surnageant de culture cellulaire non infectée est quasi-nulle, il est ici possible d'évaluer un taux d'association initiale selon la formule :

$$\left. \frac{dR}{dt} \right|_{t \sim 0} = \frac{R_{diss}}{\Delta t_{ass}} \text{ (équation 6.1)}$$

Avec R_{diss} la réponse « finale » évaluée lors de la phase de dissociation. Nous avons pu valider cette observation en évaluant la réponse SPRi suivant les deux méthodes après triple

référencement des sensorgrames (voir **Figure 65**). Ainsi, dans le cas où le surnageant de culture n'entraîne pas de signal non-spécifique élevé, il est possible d'évaluer le taux d'association initiale directement selon l'équation 6.1 sans réaliser de triple référencement.

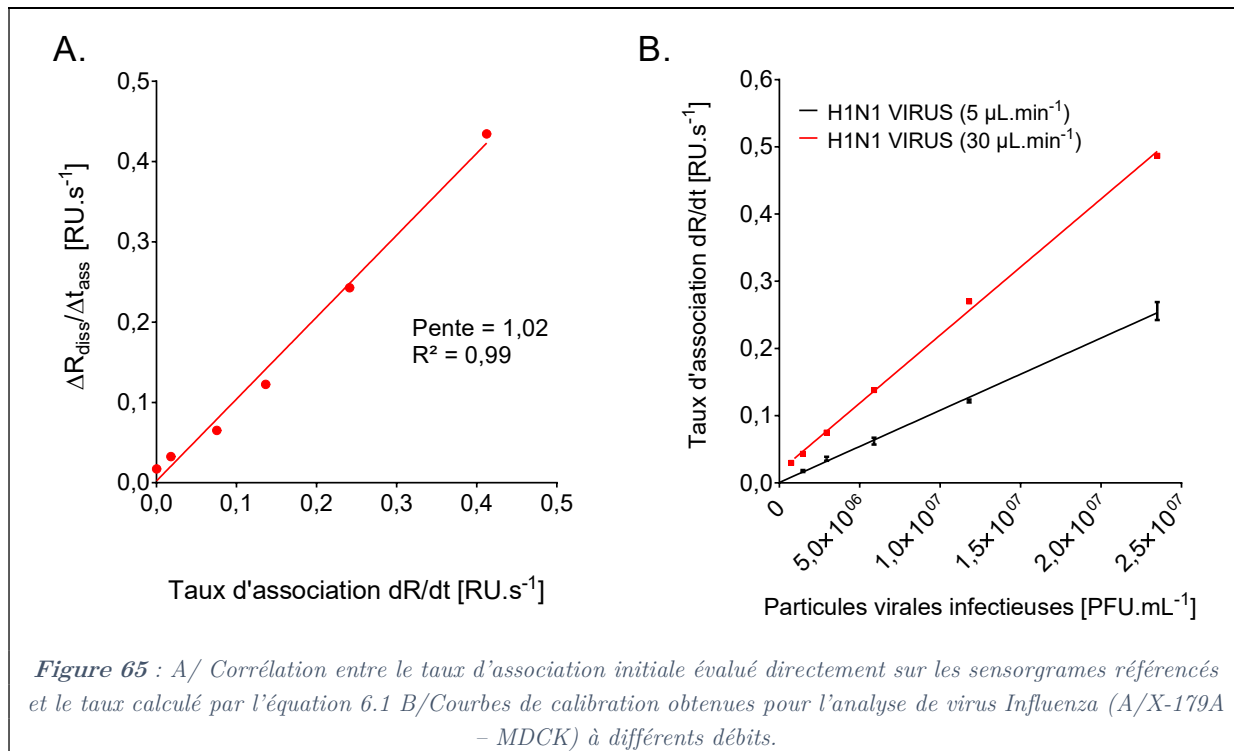


Figure 65 : A/ Corrélation entre le taux d'association initiale évalué directement sur les sensorgrames référencés et le taux calculé par l'équation 6.1 B/Courbes de calibration obtenues pour l'analyse de virus Influenza (A/X-179A - MDCK) à différents débits.

Afin de valider d'avantage que l'analyse de particules virales entières entraînait une limitation par le transfert de masse importante, des gammes de calibrations ont été réalisées à deux débits différents ($Q=5$ et $30 \mu\text{L.min}^{-1}$). Nous avons ainsi pu évaluer un coefficient de transfert de masse k_t pour les deux débits (k_t correspond aux pentes des droites de calibration de la **Figure 65B**, détaillées dans le **Tableau 27**). Ceci a permis de valider la relation $k_t \sim Q^{1/3}$ issue de la résolution analytique du coefficient de transfert de masse pour les biocapteurs surfaciques tels que ceux basés sur la SPR (voir **Chapitre III**) (195). En effet, d'après les k_t évalués pour les deux débits on obtient :

$$\frac{k_{t_{30}}}{k_{t_5}} = \frac{2,02 \pm 0,04}{1,07 \pm 0,01} = 1,89 \pm 0,06$$

$$\sqrt[3]{\frac{Q_{30}}{Q_5}} = \sqrt[3]{6} \approx 1,82$$

$$\text{On a donc : } \boxed{\frac{k_{t_{30}}}{k_{t_5}} \approx \sqrt[3]{\frac{Q_{30}}{Q_5}}}$$

La validation de cette égalité de ratios indique l'obtention de **conditions de limitation totale par le transfert de masse** tel que décrit par Pol et al. (197), ce qui induit une proportionnalité directe entre la concentration en particules virales totales actives en solution et le taux d'association initiale : $\left. \frac{dR}{dt} \right|_{t \sim 0} = k_t A_0$ (équation 6.3) (nb : en l'absence de limitation, on aurait $\frac{k_{t30}}{k_{t5}} = 1$).

VI.6. Les performances analytiques

VI.6.1. Dosage d'activité vaccinale

L'évaluation du test avec des échantillons purifiés de **vaccin** nous a permis de valider la spécificité du test pour la quantification de la HA sous forme active (absence de réponse lors de l'analyse de rHA monomérique). Nous avons également pu comparer les performances analytiques du test (**Fig 2.** et **3.**) avec celles du dosage SRID. Le test analytique offre des performances supérieures à la SRID (limite de détection de l'ordre de 10 ng HA.mL⁻¹ et gamme analytique élargie, reproductibilité $\leq 3\%CV$) et similaires à supérieures aux techniques alternatives développées pour le dosages d'activité (voir **Chapitre II – Tableau 5**).

Lors de l'analyse de vaccin, il faut souligner que les échantillons n'ont pas été traités par ajout de détergent. Par ailleurs, la validation complète du test SPRi quantitatif pour l'analyse de vaccin nécessiterait l'établissement de corrélations SRID $\leftrightarrow$ SPRi pour différentes formulations vaccinales, tel que cela a été réalisé par Khurana et al. (65). Il serait alors intéressant d'évaluer l'impact du prétraitement de l'échantillon par du détergent sur la qualité des corrélations obtenues (comparaisons des R²). L'objectif principal n'était cependant pas ici de développer un dosage d'activité vaccinal alternatif à la SRID mais de **valider la spécificité et la reproductibilité du test grâce à l'analyse d'échantillons purifiés et calibrés, avant de procéder à l'analyse de particules virales.**

VI.6.2. Analyse quantitative de particules virales entières

Nous avons par la suite réalisé une évaluation des performances analytiques pour l'analyse de **virus entier**. Le **Tableau 27** détaille les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons de virus H1N1 (surnageant de culture MDCK). La reproductibilité du test a été évaluée ici sur la base du coefficient de variation déterminé pour k_t après réalisation de n=3 calibrations. On observe que le test analytique est particulièrement reproductible car il offre un coefficient de variation inter-analyse faible (CV=2,5%). Cette caractéristique est particulièrement intéressante par rapport à la variabilité des dosages d'infectivité qui est comprise entre 10 et 50% (voir **Chapitre II**). Par ailleurs, la linéarité de la réponse a été validée sur l'ensemble de la gamme testée, de la même manière que pour l'analyse quantitative de vaccin, sur la base du taux d'association initiale (voir **Fig. 4**).

Comme il est décrit dans l'article, en comparaison des techniques dédiées à l'analyse de particules virales totales, le test analytique SPRI apparaît particulièrement reproductible (écart-type du même ordre de grandeur entre SPRI et TRPS pour les échantillons étudiés, voir encart **Fig. 5**). Comme indiqué dans la publication (§ 2.1), les limites de détection (LOD) et quantification (LOQ) ont été évaluées sur la base du k_t obtenu et de l'écart-type de la réponse σ (évalué à partir de la réponse obtenue lors de l'analyse de n=3 échantillons de milieu de culture) suivant les formules : $LOD = \frac{3,3 \sigma}{k_t}$; $LOQ = \frac{10 \sigma}{k_t}$. On observe que dans des conditions de MTL, l'augmentation du débit influe donc positivement sur la LOD (puisque $LOD \sim k_t^{-1} \sim Q^{1/3}$).

Tableau 27 : Paramètres analytiques évalués pour l'analyse de virus H1N1 (A/H1N1/reassortant/NYMCX-179) issu de culture cellulaire MDCK (échantillons de surnageant récoltés à 48 h.p.i.). Les données pour l'échantillon #1 correspondent aux courbes de calibration de la **figure 5**. Les échantillons #1 et #2 ont été analysés sur un même capteur, l'échantillon #3 sur un deuxième capteur. $\sigma = 0.001$ RU/s (n=3 pour l'échantillon #1).

Débit	30 µL/min	5 µL/min			
Echantillon	#1	#1	#2	#3	%CV
k_t [.10 ⁻⁸ RU.s ⁻¹ .mL.PFU ⁻¹]	2,02 ± 0,04	1,07 ± 0,01	1,11	1,08	2,5%
R ²	0,998	0,999	0,998	0,999	
LOD [PFU.mL ⁻¹]	1,8 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵			
LOQ [PFU.mL ⁻¹]	5,3 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶			

VI.7. L'évaluation préliminaire de constantes cinétiques

Dans l'article, nous avons réalisé des analyses SPRi cinétiques pour différents échantillons de référence (paragraphe 3.2). Concernant la **Fig. 3B**, elle correspond à l'analyse SPRi des antigènes de référence SRID. Ces derniers correspondent à du virus entier partiellement purifié (voir **Table 1**). Contrairement à ce que nous avons pu indiquer dans la publication, l'épaulement observé pour le réactif NIBSC 09/196 semble d'avantage attribuable à un effet d'association non-spécifique d'un composant de l'échantillon qu'à une différence de paramètres cinétiques. Par ailleurs, les sensorgrames obtenus lors de ces analyses présentent un profil similaire à ceux obtenus lors de l'analyse de virus issu de culture MDCK, indiquant également une limitation par le transfert de masse. Ces antigènes de références (quantifiés en terme de $\mu\text{g HA.mL}^{-1}$) apparaissent donc particulièrement intéressant en tant que calibrant lors de l'analyse de particules virales entières. Nous avons réalisé une évaluation plus poussée de ces réactifs dans le **Chapitre VIII**.

Tableau 28 : Constantes cinétiques apparentes déterminées lors de l'analyse d'échantillons de virus H1N1 (A/H1N1/reassortant/NYMCX-179) fragmentés et de vaccin commercial (Vaxigrip 2016-2017). Les sensorgrames ont été modélisés avec un modèle d'interaction 2:1 (liaison hétérogène) d'après le poids moléculaire de la HA (72 kDa).

	Constantes des taux d'association		Constantes des taux de dissociation		Constante d'équilibre de dissociation K_d		χ^2 [RU ²]
	k_{a1}	k_{a2}	k_{d1}	k_{d2}	K_{d1}	K_{d2}	
	[1/(M.s)]	[1/(M.s)]	[1/s]	[1/s]	[M]	[M]	
Virus H1N1 fragmenté	7,8E+03	1,1E+04	1,4E-05	4,6E-03	1,8E-09	4,0E-07	0,5
Vaccin trivalent	8,1E+03	1,6E+04	1,8E-04	1,6E-02	2,3E-08	1,0E-06	0,4

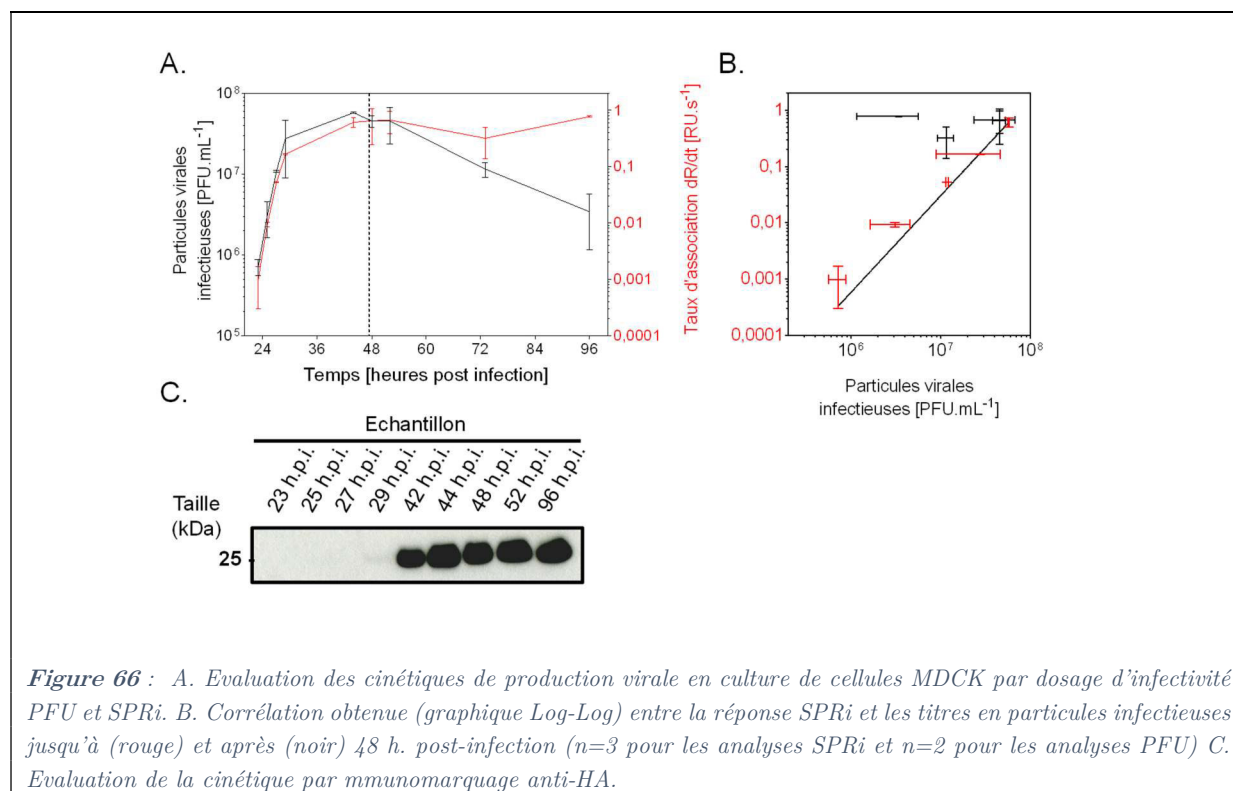
Par ailleurs, des échantillons de vaccin trivalent commercial et de lot de virus H1N1 fragmenté (produit au laboratoire, voir **Chapitre IV**) ont également été analysés afin de comparer les paramètres cinétiques apparents après modélisation par un modèle d'interaction 2:1 (voir **Tableau 28**). Nous avons alors pu évaluer des constantes d'équilibre de dissociation apparentes (K_d) plus élevées dans le cas du vaccin trivalent. Afin de procéder à une évaluation plus approfondie des constantes cinétiques apparentes de lots de vaccin (issus de virus inactivé par fragmentation), nous pouvons suggérer la méthodologie suivante :

- Réaliser une analyse/séparation préliminaire des différents constituants par chromatographie d'exclusion stérique afin de séparer les différentes formes multimériques.
- A partir de ces échantillons, réaliser une standardisation de la fraction de « multimères » séparée en termes de HA bioactive par SRID, LC-MS couplé à une digestion sélective (voir **Chapitre II**), ou par SPR quantitative grâce à la méthodologie CFCA après solubilisation des trimères de HA avec du détergent (65).
- Evaluer ensuite les constantes du taux d'association/dissociation selon des recommandations de bonnes pratiques d'analyse SPR (densité de ligand immobilisé <50 RU, débit « élevé » ~50 µL/min, gamme de dilution de l'échantillon avec 5 à 7 points couvrant la gamme [0,1*Kd ; 10*Kd], temps d'analyse permettant d'atteindre un état stationnaire).

VI.8. Evaluation des cinétiques de production virale en culture cellulaire

Afin de valider le test SPRi développé pour le suivi des cinétiques de production virales en culture cellulaire, une cinétique de production de virus H1N1 en cellules MDCK a été réalisée et analysée par différentes techniques analytiques. Les surnageants de culture obtenus après centrifugation (2000xg) ont été analysés par dosage d'infectivité (PFU), par quantification des particules totales (TRPS) et par SPRi. La **Figure 66** détaille les cinétiques de production virales évaluées pour la production de virus H1N1 en culture MDCK (Souche : A/H1N1/reassortant/NYMCX-179, MOI=10⁻³ DICT₅₀/cell). Il est possible d'établir une corrélation ($R^2 = 0,96$, droite de la **Figure 66B**) entre la réponse SPRi et les titres en particules infectieuses uniquement lors de la phase de production allant de 23 (1^{er} échantillon analysé) à 48 h post-infection (ou h.p.i.). Par la suite, on observe une diminution des titres en particules infectieuses, attribuée à une perte du pouvoir infectieux de la population de particules virales par différents mécanismes (lyse membranaire, activité protéasique, agrégation...).

Cette diminution induit une variation du ratio TP/IVP au cours de la culture cellulaire (voir **Tableau 29**). Les travaux ont également pu démontrer une bonne corrélation entre le signal SPRi et la concentration en particules virales totales (**Fig. 5.** de l'article). Nous avons enfin pu confirmer que la quantité de HA totale était stable durant la seconde phase de la culture cellulaire (lors de la perte d'infectivité) par immunomarquage (voir **Figure 66C**).



Ces observations ont permis de valider que le test SPRI quantifie les particules virales **totales et actives**. Ce test apparaît donc particulièrement intéressant pour réaliser du suivi de production virale dans le cadre de productions vaccinales, puisque les particules virales totales constituent la part majoritaire (voir **Tableau 29**) de la population de particules virales. Ces particules possèdent des antigènes membranaires HA actifs qui vont par la suite constituer l'attribut de qualité pour la formulation des lots vaccinaux (voir **Chapitre II**). Le test SPRI quantitatif a par la suite été appliqué à l'évaluation *en-ligne* des cinétiques de productions virales de cultures cellulaires en suspension (voir **Chapitre VIII**).

Tableau 29 : Paramètres évalués, par dosage d'inféctivité (PFU) et TRPS lors de l'analyse quantitative de virus H1N1, de la cinétique de production virale en culture cellulaire MDCK

Paramètres	48 h.p.i.	96 h.p.i.
Diamètre moyen	152 nm	142 nm
Particules totales (TP)	1,7 ± 0,4 x 10¹⁰ . mL⁻¹	2,1 ± 0,9 x 10¹⁰ . mL⁻¹
Particules infectieuses (IVP)	4,5 ± 0,8 x 10⁷ PFU.mL⁻¹	3,4 ± 2,2 x 10⁶ PFU.mL⁻¹
TP/ IVP	3,8 x 10²	6,3 x 10³

VII.

DÉVELOPPEMENT DE BIOPUCES SPRi MULTIPLÉXÉES POUR L'ANALYSE QUALITATIVE DES BIOPROCÉDÉS DE PRODUCTION DE VACCIN INFLUENZA

VII.1. Introduction

En parallèle du développement de tests SPRi quantitatifs, nous avons cherché à développer des modèles de biopuces multiplexées pour l'évaluation qualitative des productions vaccinales de virus Influenza. Dans un premier temps, nous avons cherché à développer une biopuce SPRi pour l'analyse de vésicules extracellulaires issues de cultures cellulaires dédiées à la production de virus influenza. Nous avons également développé et réalisé l'évaluation préliminaire d'une biopuce SPRi à glycanes multiplexée afin d'évaluer l'impact de différents paramètres sur la réponse SPRi lors de l'évaluation de l'activité de vaccin influenza, à savoir le type de liaison terminale et la densité surfacique de ligand.

VII.2. Développement de biopuces multiplexées pour l'évaluation de paramètres de qualité des productions d'antigènes vaccinaux d'influenza

Comme vu dans le **chapitre II**, l'activité vaccinale constitue un attribut de qualité critique (*CQA*) du vaccin influenza, puisqu'elle va impacter la qualité du produit en termes d'efficacité. D'autres attributs de qualité doivent également remplir les critères réglementaires fixés pour la formulation finale des lots vaccinaux et constituent le profil cible de qualité du produit (détaillé dans le **Tableau 1, Chapitre I**). Le développement de tests SPRi multiplexés permettant une évaluation parallèle de différents attributs de qualité critique au sein des procédés de production apparaît particulièrement intéressant. Nos objectifs étaient ici de développer des modèles de biopuces permettant :

- D'une part, d'évaluer l'impact de différents paramètres biologiques sur la réponse SPRi tels que le type de liaison terminale (α -2,3 et α -2,6) et la densité surfacique de ligand de la biopuce SPRi. L'objectif était de caractériser les paramètres impactant potentiellement la mesure d'activité vaccinale à partir d'interactions glycanes-HA. Nous souhaitions également comparer les paramètres analytiques obtenus lors de l'utilisation de glycanes mono- et multi-valents par rapport à ceux obtenus avec la fétuine lors de notre étude préalable de développement d'une analyse quantitative de HA/virus par SPRi.
- D'autre part, de quantifier certains des contaminants d'origine cellulaire, ici les vésicules extracellulaires retrouvés dans les phases USP des procédés de production vaccinaux à base de culture cellulaire, afin de pouvoir amener des compléments d'information sur la qualité et la pureté des lots USP produits.

VII.3. Conformation des antigènes vaccinaux et évaluation de l'avidité

Comme il a été vu dans le **chapitre III**, les dosages d'activité vaccinale quantifient uniquement la HA sous forme trimérique obtenue après solubilisation à l'aide de détergents. L'émergence de stratégies vaccinales alternatives au vaccin inactivé traditionnel soulève des problématiques supplémentaires pour le développement de techniques analytiques alternatives au dosage d'activité traditionnel basé sur la SRID. Ces stratégies sont par exemple :

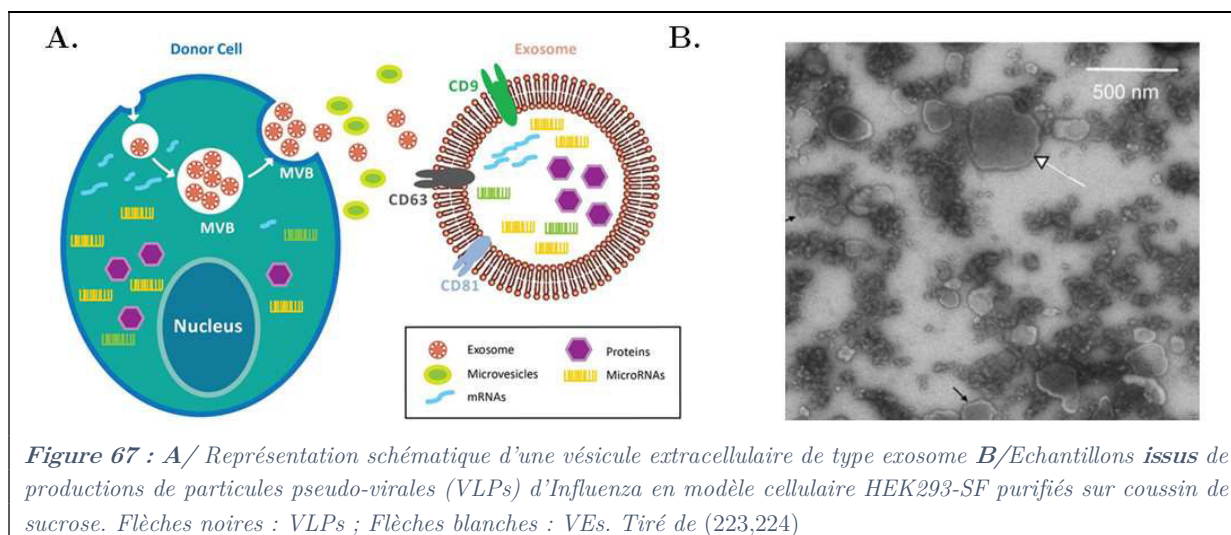
- Basées sur des substrats cellulaires/plateformes d'expression (ex : vaccin recombinant fluBlok® produit en cellules d'insectes Sf9, vaccins produits en cellules de mammifères, voir Chapitre I) qui entraînent des différences en termes de modification post-traductionnelles des antigènes vaccinaux exprimés.
- Basées sur la production d'antigènes vaccinaux sous forme de particules entières exhibant une densité surfacique élevée de HA (virosoles, particules pseudo-virales).

En effet, lors du développement de dosages d'activité alternatifs à la SRID, un point bloquant majeur est la variabilité de la réponse observée en fonction des antigènes de référence utilisés. Kuck et al. ont attribué cette variabilité aux différents degrés de valence (multimères de type rosettes) et à « des différences de degré de modification chimique des antigènes de référence en comparaison des lots de vaccins, qui entraînent une avidité réduite pour les antigènes de référence » lors de l'évaluation du test Vaxarray (70). Les études structurales réalisées récemment sur différentes formulations vaccinales tendent à montrer que la valence antigénique des multimères De HA contenus dans les préparation de vaccin inactivé par fractionnement varie (180,181). Par ailleurs, des travaux récents ont évalué que le degré de valence des antigènes vaccinaux influence l'immunogénicité vaccinale (219,220).

Comme il a été vu dans le **Chapitre III**, le développement de nouveau tests analytiques basés sur la SPR pourrait permettre de caractériser plus précisément les relations structure-activité pour différentes conformations antigéniques retrouvées au sein des procédés de production de vaccin influenza à savoir des particules virales entières ou pseudo-virales, des rosettes de valence variable comportant plusieurs sous-types de HA ou bien d'autres types de multimères.

VII.4. Contaminants issus de la culture cellulaire

Les vésicules extracellulaires (ou VEs) sont des vésicules dont la taille varie entre 50 nm et 1 μ m. Elles sont sécrétées par les cellules et constituées d'une bicouche lipidique issue de l'une des membranes cellulaires. Ces vésicules peuvent encapsuler de différents composants d'origine cellulaire, par exemple des protéines solubles ou des acides nucléiques (221,222).



Les vésicules extracellulaires, et en particuliers les exosomes, présentent des caractéristiques (structurelles et physicochimiques) et des voies de synthèse proches des particules virales. Cette similarité rend leur séparation difficile (225,226). Il a par ailleurs été démontré la présence de vésicules extracellulaires dans des productions de particules pseudo-virales d'Influenza réalisées en modèle cellulaire HEK293 (224–226) et que ces dernières représentent une source de contaminants de type acides nucléiques et de protéines d'origine cellulaire au sein des procédés de production (227). Puisque ces contaminants répondent à des limites réglementaires pour la libération des lots vaccinaux (voir **Chapitre I**), la concentration en VEs constitue un attribut de qualité potentiel à évaluer lors du développement de procédés vaccinaux basés sur la culture cellulaire.

Les VEs sont des entités biologiques récemment découvertes et nécessitent le développement de techniques analytiques spécifiques dédiées à leur caractérisation (221). Dans ce but, différents test SPR ont récemment été développés pour l'analyse de vésicules extracellulaires issues de lignées cellulaires humaines cancéreuses (228–230). Nous avons ici cherché à développer une biopuce basée sur la SPRi pour l'analyse des VEs au sein des procédés de productions vaccinaux.

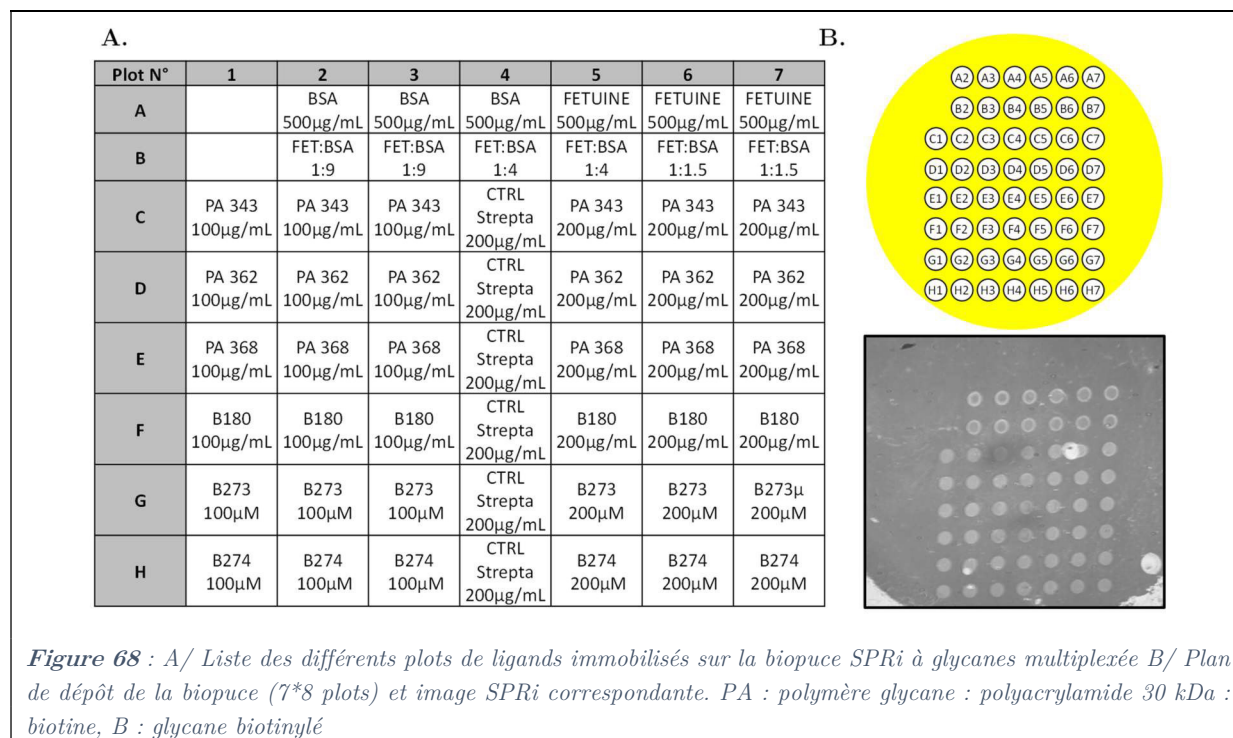
VII.5. Biopuce SPRi multiplexée pour la caractérisation des relations structure activité entre l'hémagglutinine virale et les glycanes

Comme il a été détaillé dans le **Chapitre III**, les avancées techniques dans le domaine des biocapteurs ont permis le développement récent de test analytiques sans marquage pour l'évaluation des relations structure-activité du virus influenza et de ses antigènes membranaires (évaluation de l'affinité/avidité relative HA-glycane, étude des interactions virus-membrane). Récemment, McBride et al. ont développé un modèle de biopuce à glycanes multiplexée pour l'évaluation de l'avidité de la HA virale issue de différents virus Influenza basée sur l'utilisation de glycanes mono- et multivalents (par lecture d'immunofluorescence en point final après marquage secondaire) (167,176). Les auteurs ont évalué une affinité apparente supérieure dans le cas de l'utilisation de ligands multivalents attribué à un effet d'avidité (167). Nous avons ici cherché à réaliser une biopuce SPRi multiplexée afin de caractériser les interactions biomoléculaires entre la HA virale et différents ligands.

VII.5.1. Réalisation de la biopuce multiplexée et des analyses

Les biopuces ont été réalisées grâce à la technique de dépôt sans contact à l'aide d'un appareil Scienion sciFlexarrayer S3 suivant la grille de dépôt décrite dans la **Figure 68**. Le protocole complet est décrit dans le **Chapitre IV : Matériel & Méthodes**. Différents ligands (fétuine, glycanes synthétiques mono- ou multivalent) ont été immobilisés en parallèle sur la biopuce SPRi. Pour l'appellation des glycanes utilisés, il est possible de se reporter au **Tableau 17**. Les évaluations cinétiques à l'équilibre ont été réalisées sur la base d'analyse en cycle unique (ou *Single Cycle Kinetics* – SCK) afin de limiter les cycles de régénération du capteur et la durée d'analyse. La détermination du taux d'association a été évaluée sur la base d'analyses classiques après régénération de la surface, en calculant la pente de la réponse sur les 60 premières secondes de la phase d'association. Des solutions de vaccin trivalent commercial (Vaxigrip 2017-2018, Sanofi Pasteur) ont été réalisées par dilution en série dans du tampon PBS-T (Oseltamivir carboxylate 10µM, Tween 0,005%) puis injectées selon un mode semi-automatisé à l'aide d'une boucle d'injection HPLC activée manuellement. Une calibration de la réponse SPRi pour chacun des plots de ligand a été réalisée avant analyse par passage d'une solution de glycérol à 0,5% en

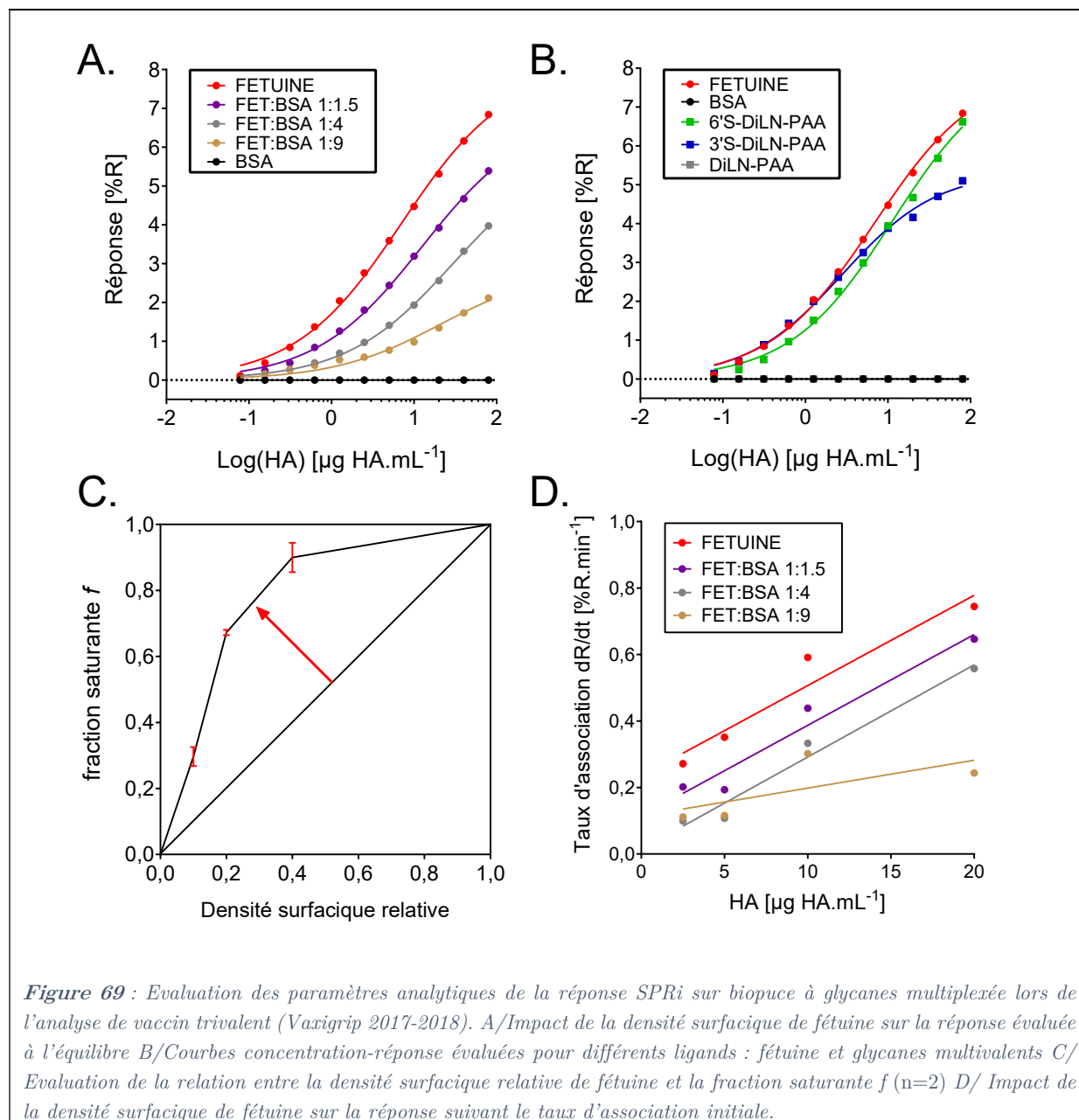
tampon PBS-T afin d'évaluer un facteur correctif à appliquer à chaque signal (voir **Chapitre IV**).



VII.5.2. Résultats et conclusions

De la même manière que pour le test SPRi quantitatif précédemment développé, nous avons évalué la biopuce SPRi multiplexée en analysant des échantillons de vaccin commercial purifié et de concentration en µg HA.mL⁻¹ connue. La **Figure 69** détaille les résultats obtenus lors de l'analyse de vaccin trivalent par la biopuce SPRi multiplexée. L'impact de la densité surfacique de ligand sur la réponse SPRi a été évalué par immobilisation de solutions de Fétuine/BSA à différents ratios (v/v). Le **Tableau 30** détaille les paramètres cinétiques évalués pour les analyses détaillées dans la **Figure 69**. On observe un décalage des courbes concentration-réponse lorsque le ratio Fétuine/BSA diminue. Il est possible d'évaluer la réponse selon un modèle logistique (ou équation de Hill) : $R_{eq} [\%R] = \frac{R_{max}}{1 + \left(\frac{A_0}{CE_{50}}\right)^{n_{Hill}}}$ ou $\theta = \frac{R}{R_{max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{A_0}{CE_{50}}\right)^{n_{Hill}}}$ (équation 8.1) dont les paramètres évalués sont décrits dans le **Tableau 30**.

Avec R_{max} la réponse maximum (plateau), A_0 la concentration d'analyte, CE_{50} la concentration efficace pour atteindre 50% de R_{max} et n_{Hill} le coefficient de Hill qui permet en théorie d'évaluer la coopérativité de l'interaction ⁶.



Lors de l'interprétation des données pour différentes densités surfaciques de fétuine suivant le modèle logistique, la concentration des lots de vaccins évalués ($90 \mu\text{g HA.mL}^{-1}$) ne nous a pas permis d'atteindre la saturation de la surface qui se traduit par l'obtention d'un plateau pour

⁶ Dans le cas d'une interaction suivant un modèle 1 : 1, $n_{Hill} = 1$ et on obtient $CE_{50}=K_d$.

les courbes concentration-réponse (**Figure 69A**). Cependant, cette concentration était suffisante pour obtenir des coefficients de régression $R^2 \geq 0,99$ pour l'ensemble des analyses.

Les courbes concentration-réponse réalisées nous permettent de valider que la densité surfacique de ligand impacte la réponse SPRi évaluée à l'équilibre (R_{eq}) pour les interactions glycanes-HA (voir **Figure 69A et C**). En effet, d'après les paramètres évalués (**Tableau 30**), on observe une diminution de R_{max} et une augmentation de la valeur de CE_{50} évaluée lorsque la densité surfacique de ligand diminue (voir **Annexe I**). A l'inverse, le coefficient de transfert de masse k_t (évalué sur la base du taux d'association initiale dR/dt) ne diffère pas statistiquement pour les 3 densités surfaciques de fétuine les plus élevées ($k_t = 2,74 \pm 0,04.10^{-2} [\%R.min^{-1}. \mu g HA^{-1}.mL]$, écart-type relatif = 0,7%). Pour le plot FET:BSA 1:9, le dR/dt évalué pour une concentration de 20 $\mu g HA.mL^{-1}$ apparait relativement bas et impacte le k_t évalué. Il apparait pertinent de reproduire ces analyses afin d'évaluer plus précisément les k_t pour différentes densités surfaciques de ligand.

À partir des données du **Tableau 30**, il est possible d'évaluer la relation entre la densité surfacique relative de fétuine et la fraction saturante $f = R_{max}(FET:BSA)/R_{max}(FET)$. Cette méthodologie a précédemment été exploitée pour évaluer le degré d'avidité relatif de différentes souches virales d'influenza (231). Il apparait que f n'est pas linéairement proportionnelle à la densité surfacique de fétuine immobilisée. En effet, la **Figure 69C** indique un effet d'avidité au niveau des interactions biomoléculaires réalisées entre les multimères de HA et les glycanes présents en surface de la fétuine (effet illustré par la flèche rouge).

Concernant l'évaluation de différents glycanes mono- et multivalents, seul les glycanes multivalents ont permis d'obtenir une réponse SPRi quantifiable (et similaire aux deux densités surfaciques de ligand multivalent évaluées). Par rapport aux constantes d'affinité précédemment évaluées (en unité [M]) pour l'interaction entre la fétuine et les multimères de HA contenus dans le vaccin commercial (voir **Tableau 28**), on observe que les K_d apparents évalués sur les deux plateformes SPRi sont du même ordre de grandeur ($K_d \sim 10^{-7}$ M). Par ailleurs, les courbes concentration-réponse obtenues lors de l'utilisation de glycanes multivalents indiquent un K_d apparent du même ordre de grandeur que pour la fétuine. Les k_t évalués pour ces ligands sont supérieurs, ce qui indique qu'ils pourraient offrir une sensibilité supérieure pour un test SPRi

quantitatif. Ces résultats restent à confirmer sur une plateforme SPRi plus résolutive dans des conditions de limitation par le transfert de masse (MTL) validées.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont cohérents avec les performances analytiques du même ordre de grandeur (sensibilité, gamme de travail) évaluées entre les dosages d'activité SPR/ELISA basés sur l'utilisation de glycanes (voir **Chapitre II**) et le test analytique SPRi précédemment développé (voir **Chapitre VII**).

Tableau 30 : Paramètres cinétiques évalués à partir des courbes concentration-réponse issues de l'analyse d'échantillons de vaccin commercial (Vaxigrip 2016-2017) pour différents ligands et/ou différentes densités surfaciques de ligand sur la base d'un modèle logistique. Le CE_{50} est identique au K_D dans le cas d'un modèle d'interaction 1 : 1.

Ligand		R_{max}	CE_{50}		R^2	k_t	R^2
		[%R]	[$\mu\text{g HA.mL}^{-1}$]	[M]		[%R.min ⁻¹ . $\mu\text{g HA}^{-1}.\text{mL}$]	
Fétuine		8,1	5,6	7,8.10 ⁻⁸	0,988	0,027	0,93
Fétuine : BSA	1 : 1,5	6,9	8,6	1,2.10 ⁻⁷	0,989	0,027	0,95
	1 : 4	6,0	17,7	2,5.10 ⁻⁷	0,993	0,028	0,97
	1 : 9	2,9	26,6	3,7.10 ⁻⁷	0,988	0,008	0,5
6S'-diLN-PAA		8,2	11,4	1,6.10 ⁻⁷	0,997	0,069	0,97
3S'-diLN-PAA		5,3	2,7	3,8.10 ⁻⁸	0,995	0,037	0,89

VII.5.3. Perspectives

Nous avons ici pu valider que la densité surfacique de ligand impacte la réponse SPRi à l'équilibre, rejoignant des observations précédentes (231,232). Il est donc important d'obtenir une densité surfacique de ligand constante lors de la réalisation de dosages d'activité/de stabilité selon cette méthodologie. Par exemple, dans le cas du couple ligand-analyte HA-glycane, il est important d'inhiber la lyse des acides sialiques par la NA virale si une régénération du capteur est réalisée. Nous avons également validé que l'utilisation de fétuine ou de glycanes synthétiques multivalents offraient des performances analytiques similaires. Par ailleurs, la puce SPRi multiplexe réalisée constitue un modèle permettant une évaluation de l'avidité relative qui pourrait être utilisée afin de comparer l'avidité relative de différentes souches virales ou formulations vaccinales (par exemple : des formulations de HA multimériques à différents degrés

de valence). Il serait alors intéressant de réaliser une fonctionnalisation de la biopuce à différentes densités surfaciques de glycanes multivalents d'extrémité terminale avec une liaison α -2,3 et α -2,6 (ratio 3/6S'-diLN-PAA : diLN-PAA) comme cela a été réalisé pour la fétuine, afin de pouvoir évaluer l'avidité relative pour ces deux liaisons terminales. Le transfert de ce test sur la plateforme d'analyse *Octet* basée sur l'interférométrie apparaît pertinent pour l'évaluation de l'avidité relative de particules virales car cette plateforme permet des temps de résidence suffisamment élevées (heure) pour l'obtention d'un état d'équilibre avec un volume d'échantillon réduit.

Les k_t évalués sur la base du taux d'association (dR/dt) initial ne diffèrent pas significativement pour les trois densités surfaciques de fétuine les plus élevées. Ces résultats rejoignent résultats précédents sur la SPR quantitative qui ont démontré que le taux d'association initiale évalué **pour des densités surfaciques de ligand élevées** devenait indépendant de la densité surfacique de ligand et des paramètres cinétiques du couple ligand-analyte (203,233). Cela démontre la robustesse de cette méthodologie SPR(i) quantitative pour la réalisation de dosages d'activité vaccinale. Il faut cependant noter que des k_t significativement supérieurs ont été évalués pour les glycanes synthétiques. Une piste d'explication serait celle d'une limitation par le transfert de masse partielle obtenue dans les conditions d'analyses. La réalisation d'analyses comparatives complémentaires sur la plateforme SPR-2 serait intéressante.

La réalisation de dosages d'activité par SPR(i) apparaît également particulièrement intéressante puisqu'elle permet dans le même temps: a) une évaluation en temps réel du degré d'immobilisation de ligand, contrairement à d'autres techniques (ELISA), b) de valider l'obtention d'un état d'équilibre pour la réalisation de dosages en point final, c) l'évaluation concomitante de paramètres cinétiques (k_a , k_d) dont la variation influence la réponse SPR(i) (234). Karlsson et al. ont récemment évalué différentes méthodologies (EC_{50} , PLA, CFCA, voir **Annexe 2**) pour la réalisation de dosages d'activité par SPR et ont démontré qu'une variation de k_a influence l'activité relative de la même manière qu'une variation de concentration (234). Le même groupe a également prédit que l'impact des effets d'avidité sur les analyses SPR quantitative (CFCA) était négligeable dans le cas de concentrations relativement faibles et de l'ordre du nM (195).

VII.6. Biopuce SPRi pour l'analyse de vésicules extracellulaires

Comme il a été détaillé en introduction de ce chapitre, nous avons ici cherché à développer une biopuce basée sur la SPRi pour la détection et la quantification des VEs puisque l'évaluation de ces contaminants représente un attribut de qualité potentiel des procédés de production vaccinaux basés sur la culture cellulaire.

La stratégie adoptée ici a été de produire et caractériser des échantillons de virus influenza et d'exosomes purifiés. Le but était d'une part d'obtenir des lots d'échantillons références pour le développement des puces multiplexées, et dans un deuxième temps de pouvoir potentiellement définir des cibles protéiques spécifiques à la population de vésicules extracellulaires. En effet, différentes études ont démontré que les particules virales d'influenza issues de cultures cellulaires incorporent des protéines de la famille des tétraspanines (CD9, CD81), suggérant que les particules virales et les exosomes issus de cultures cellulaires partagent des voies d'expression/de transport cellulaires (158,235). Cette identification devait être réalisée par analyse protéomique LC-MS/MS mais n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ces travaux. Nous avons néanmoins choisi d'évaluer différents anticorps ciblant des marqueurs protéiques membranaires de la famille des tétraspanines comme ligands de nos puces multiplex. En effet, celles-ci sont considérées à l'heure actuelle comme des marqueurs protéiques membranaires de la population de vésicules extracellulaires. Le degré d'homologie des tétraspanines entre différents hôtes cellulaires a été évalué à l'aide de l'outil d'alignement BLAST et de la base de données UniprotKB (voir **Tableau 31**). En effet, les anticorps choisis dans ces travaux ont été développés pour cibler des tétraspanines humaines alors que la production de virus influenza est réalisée sur différentes lignées de cellules animales (origines de lignées ciblées : humaine – HEK293, canine – MDCK, aviaire – Duckcellt-17, porcine - PBG.PK2.1). Le **Tableau 31** indique cependant le pourcentage d'identité des tétraspanines entre les différents hôtes. Ainsi, on observe une forte homologie de leurs séquences protéiques entre les formes humaine et canine par exemple (>90%). Par ailleurs, l'homologie de séquence protéique entre les formes humaines et aviaires apparaît plus faible, ce qui permet de valider l'utilisation de cellules MDCK et HEK293 pour la réalisation de cette étude. Afin d'obtenir des contrôles positifs, les antigènes correspondants (CD9, CD63 et CD81) aux anticorps choisis ont été utilisés (voir **Tableau 19**).

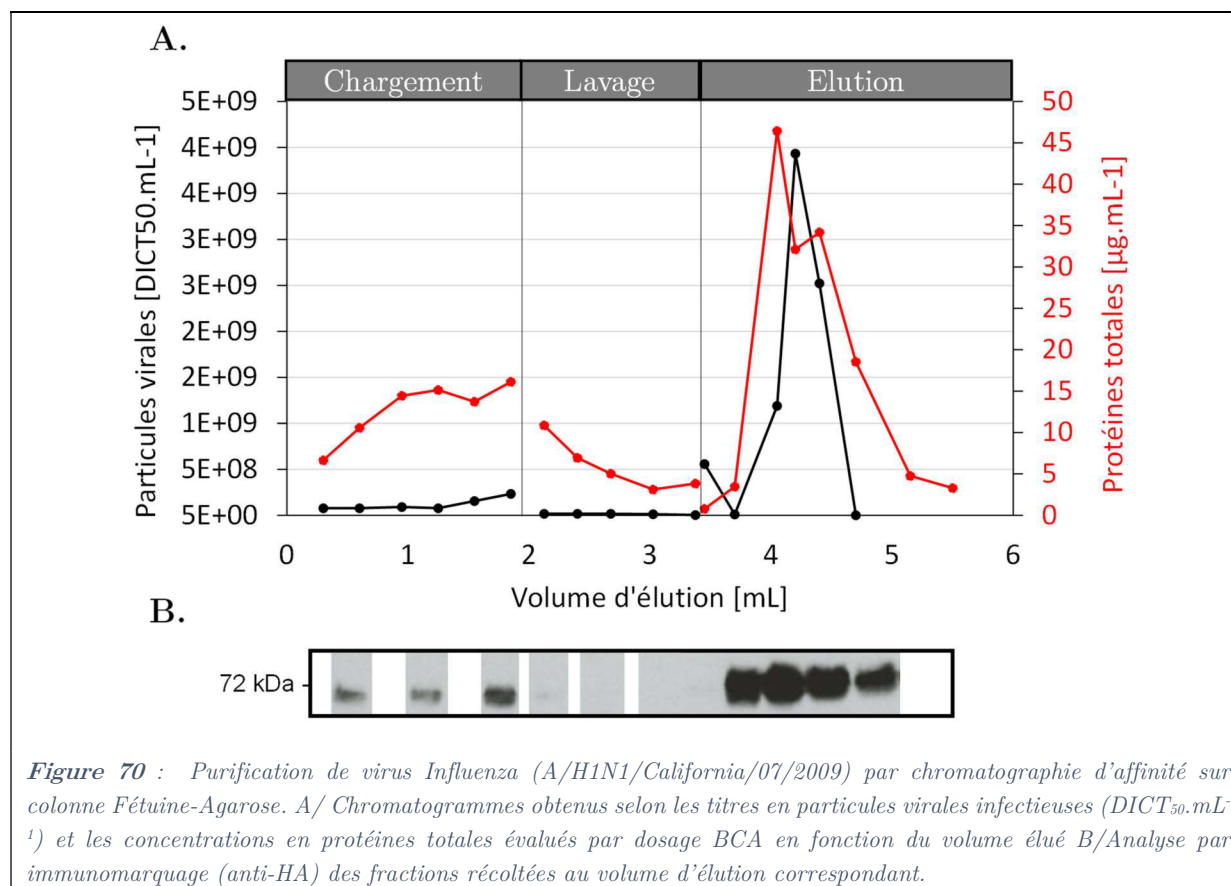
Tableau 31 : Evaluation du degré d'homologie entre les tétraspanines chez les différentes lignées cellulaires utilisées pour la production virale d'influenza. Données : UniprotKB et BLAST. NR : non renseigné

Protéine	Humaine	Canine (<i>Canis familiaris</i>)		Aviaire (<i>Anas</i>)		Porcine (<i>Sus scrofa</i>)	
	Référence	Référence	% Ident.	Référence	% Ident.	Référence	% Ident.
CD9	P21926	F1PQM7	91	U3I4R8	76	Q8WMQ3	89
CD63	P08962	F1PIT4	90	NR	NR	F1SPK8	87
CD81	P60033	F1PB66	97	A0A493SSB6	87	Q8WMQ3	47

VII.6.1. Production d'un lot de virus influenza H1N1 concentré et purifié

La lignée cellulaire que nous avons choisie pour référence lors de la production de virus influenza et de vésicules extracellulaires a été la lignée canine MDCK. En effet, cette lignée est l'une des lignées cellulaires principalement utilisées pour la production de vaccin influenza et est l'une des seules lignées cellulaires utilisées pour la production d'un vaccin commercial (22,236). Nous avons produit deux lots de matériels purifiés suivant les protocoles de purification détaillés au **Chapitre V : Matériel et méthodes**, pour un virus influenza A/H1N1/California/07/2009 et des VEs issues de la même lignée cellulaire. Les résultats obtenus qui caractérisent le procédé de purification des deux matériels de référence sont présentés dans la **Figure 70** et la **Figure 71**. Pour la séparation des particules virales d'influenza de contaminants de culture de type VEs (et autres contaminants résiduels : protéines et acides nucléiques originaires de la cellule hôte), il a été choisi de mettre en place une étape de chromatographie d'affinité après purification et concentration par ultracentrifugation (voir **Figure 42**).

La **Figure 71** présente les résultats de la purification de virus Influenza (souche A/H1N1/California/07/2009) par chromatographie d'affinité sur colonne Fétuine-Agarose. Nous avons collecté 19 fractions au cours de la chromatographie d'affinité, nous permettant d'isoler les particules virales dans les fractions 13 à 17, correspondant au pic d'élution de virus obtenu lors de l'ajout de tampon d'élution à la concentration de 1,5 M en NaCl. La présence d'un pic d'élution de particules virales a été validé par dosage d'infectivité (DICT₅₀) des fractions récoltées. Les fractions collectées ont été assemblées et concentrées/diafiltrées par filtration membranaire dans le but d'obtenir un échantillon de référence pour des analyses LC-MS-MS.



VII.6.1. Production d'un lot de vésicules extracellulaire concentrées et purifiées

L'obtention du lot de vésicules extracellulaires purifiées issues de cellules MDCK a été réalisée selon le procédé décrit dans la **partie V.3**. Nous avons initialement cherché à réaliser un procédé de purification similaire à celui réalisé pour la production des lots de virus influenza (cousin d'iodixanol 10% - gradient d'iodixanol 10-40% - 112 000xg). Cependant, les concentrations en protéines totales des fractions collectées étaient sous la limite de détection du test BCA ($<5\mu\text{g.mL}^{-1}$), indiquant un rendement de purification faible avec ce procédé. Nous avons par la suite réalisé une ultracentrifugation à 18 000xg du surnageant de culture MDCK (récolté à 72 h après changement de milieu des cellules à confluence), suivi d'une filtration membranaire à 30 kDa pour diafiltrer les échantillons dans un tampon PBS et d'une filtration d'exclusion par la taille (voir **Tableau 23**) afin de séparer les VEs des contaminants protéiques. Les lots de vésicules extracellulaires ont ensuite été quantifiés et caractérisés par des analyses TRPS. La **Figure 71** représente le profil d'élution obtenu lors de la purification d'échantillons de VEs sur colonne SEC et l'analyse TRPS de la population de VEs purifiée.

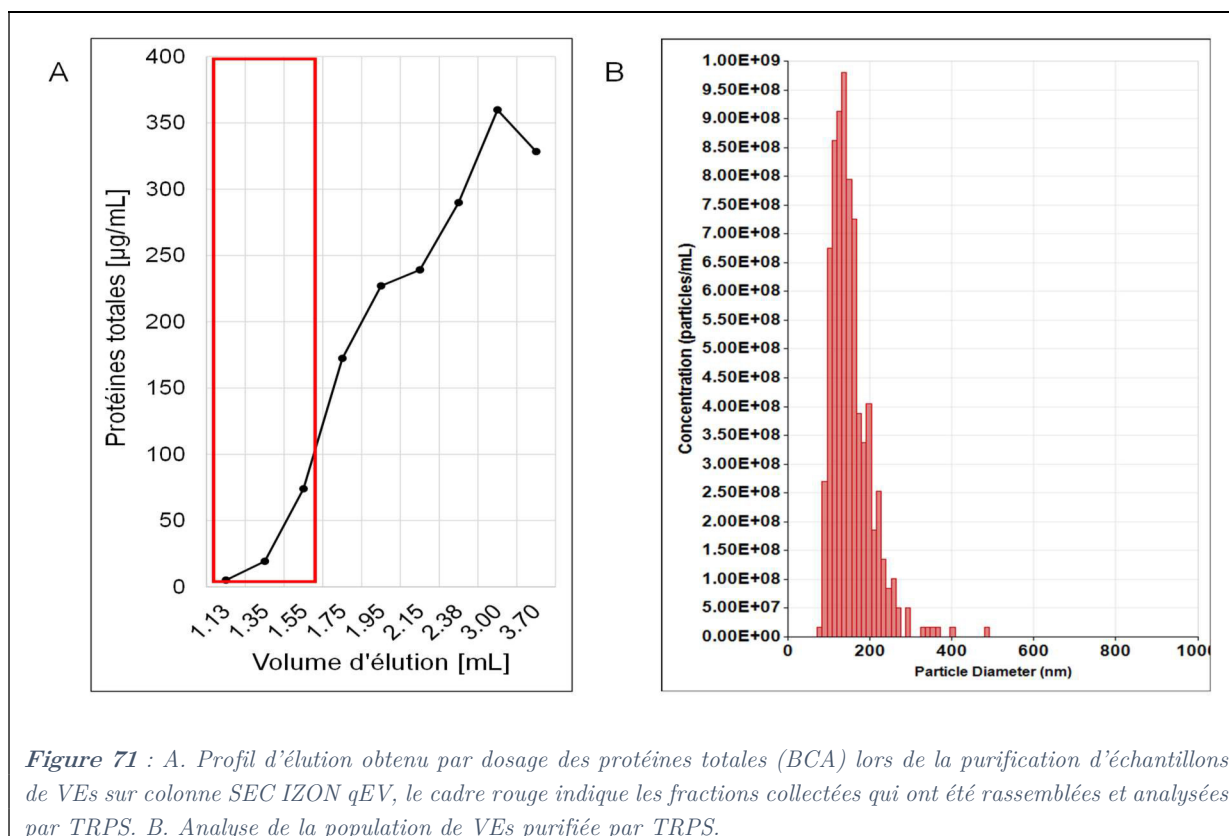


Figure 71 : A. Profil d'élution obtenu par dosage des protéines totales (BCA) lors de la purification d'échantillons de VEs sur colonne SEC IZON qEV, le cadre rouge indique les fractions collectées qui ont été rassemblées et analysées par TRPS. B. Analyse de la population de VEs purifiée par TRPS.

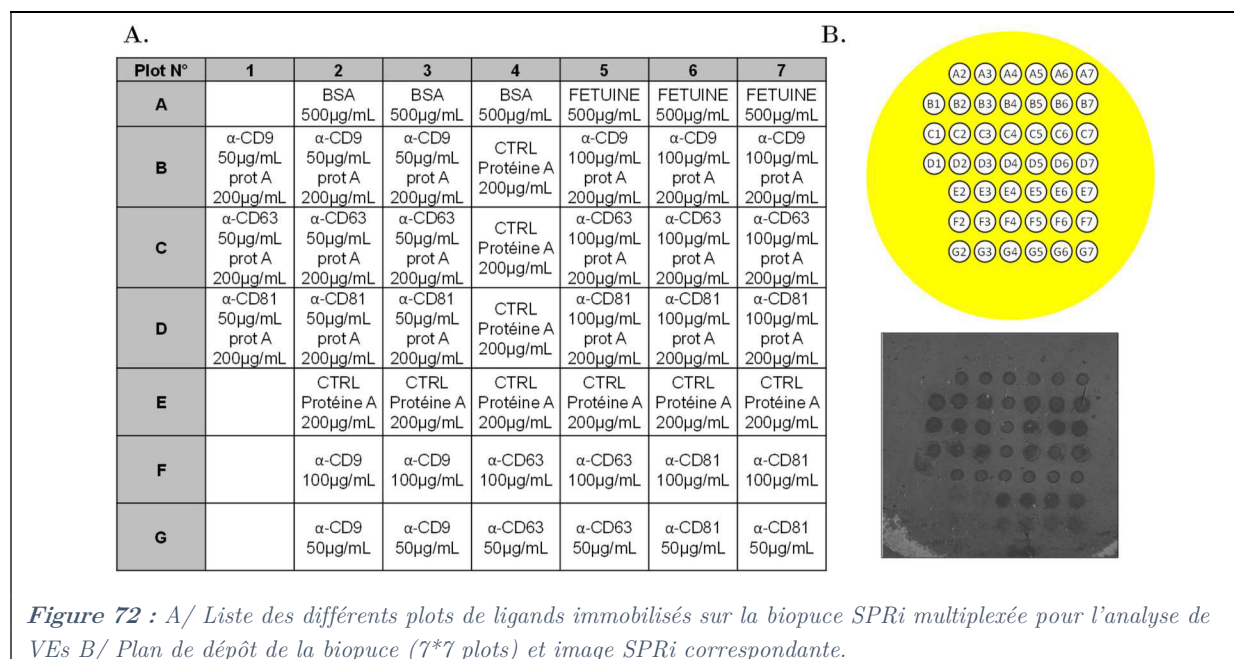
Les analyses TRPS ont montré que la population de VEs présentait une distribution de taille unimodale (à un seul pic) de diamètre moyen de 140 nm et de diamètre modal de 108 nm (**Figure 71B**). Cette valeur de diamètre des particules est conforme à celui décrit précédemment pour les populations de VEs issues d'autres lignées cellulaires (237). Ainsi, la concentration en vésicules extracellulaires de la lignée MDCK dans les conditions étudiées a pu être évalué à $2,6 \cdot 10^7$ VEs.mL⁻¹ (en assumant aucune perte en VEs au cours du procédé de purification, cette concentration est donc probablement sous-évaluée). Dans notre cas ceci équivaut à $4,2 \cdot 10^{-1}$ VEs.cellule⁻¹.h⁻¹ en considérant un volume de 20 mL de surnageant de culture par T-175 cm². En comparaison, lors de productions virales la productivité en particules virales totales pour une culture de cellules MDCK dans des conditions identiques a pu être évaluée à 110 ± 30 virus.cellule⁻¹.h⁻¹. Il y a donc une différence de 3 ordres de grandeur entre la productivité cellulaire évaluée en particules totales pour des VEs et du virus H1N1 dans la lignée MDCK. Par ailleurs, en termes de protéines totales, le procédé de purification mis en place a permis d'obtenir un facteur de purification de 99,98% (voir **Tableau 32**).

Tableau 32 : Evaluation du procédé de purification développé pour la production de vésicules extracellulaires sur lignée MDCK.

Paramètres	Etape				
	Surnageant de production / T-175 cm ²	Clarification 2000xg	Ultracentrifugation 18000xg – 30 min	Rétentat Filtration 30 kDa	Éluat SEC
Concentration en VEs [VEs.mL ⁻¹]	2,6.10 ⁷	2,6.10 ⁷	1,2.10 ¹⁰	1,2.10 ¹⁰	1,2.10 ¹⁰
Concentration en protéines totales [µg.mL ⁻¹]	890	890	N.D.	2480	104
Volume [mL]	20	450	1	~ 1	~ 1
F _{conc} cumulatif (volumique)	-	1	450	~ 450	~ 450
Quantité de protéines totales [mg]	18	400	N.D.	2,5	0,1
R _{purif prot.} %	-	1	N.D.	99	99,98

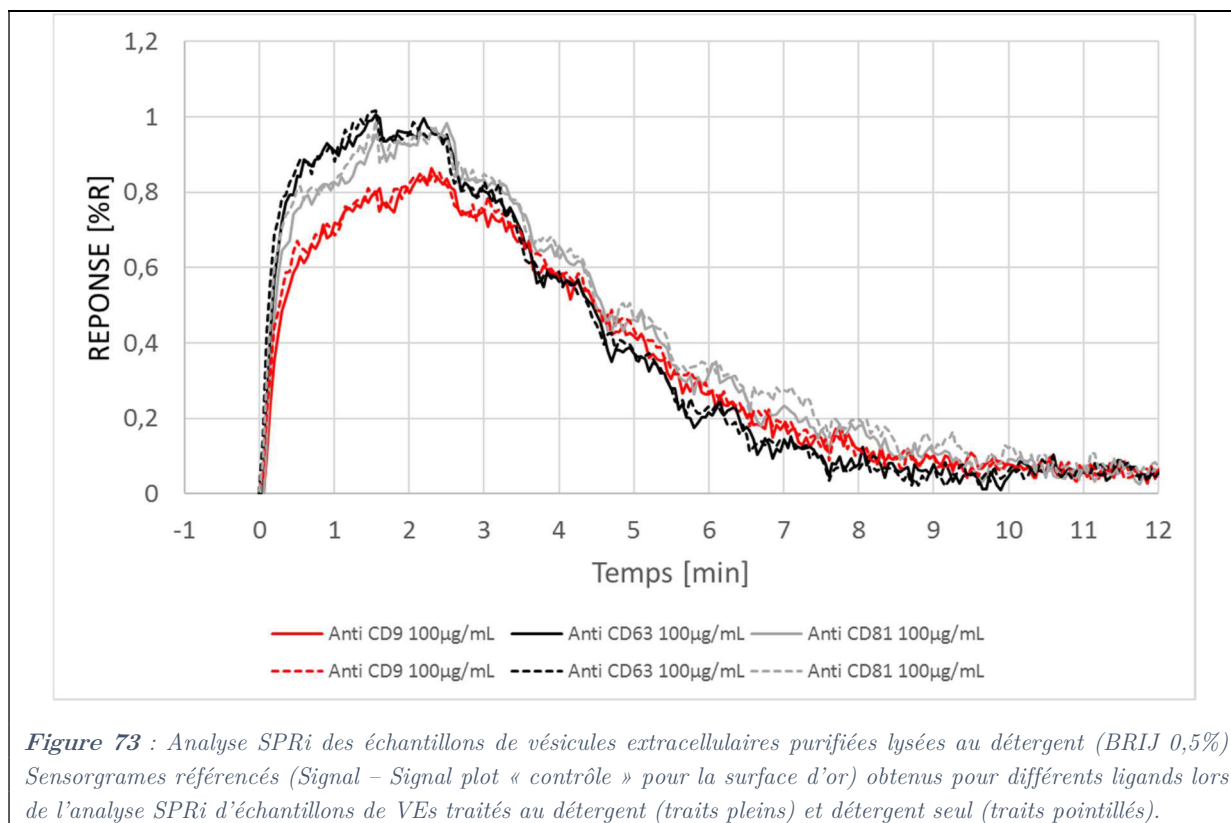
VII.6.2. Réalisation de la biopuce

Les biopuces ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le **Chapitre IV : Matériel & Méthodes**. La biopuce a été réalisée par technique de dépôt sans contact à l'aide d'un appareil Scienion sciFlexarrayer S3 suivant la grille de dépôt décrite dans la **Figure 72**. Les anticorps ont été déposés à deux concentrations (50 et 100µg/mL), soit directement sur la surface soit sur des plots de protéine A immobilisée à partir d'une solution à 200 µg/mL. Des plots « contrôle » avec uniquement la protéine A immobilisée ont également été réalisés.



VII.6.3. Résultats analytiques

Des analyses SPRi ont été réalisées sur les échantillons de VEs purifiés produits sur cellules MDCK. La première série d'analyses a été réalisée en système statique avec le dépôt de 100 μ l de VEs purifiées diluées dans du tampon PBS-T ($F_{\text{dil}} = 1/64 \rightarrow 1/2$) et une incubation de 1h à température ambiante. Cette première série d'analyses n'a pas permis de détecter de réponse SPRi. Afin de valider la fonctionnalité de notre greffage d'anticorps anti-tétraspamine, nous avons déposé différentes solutions d'antigènes recombinants (CD9, CD63 et CD81) sur la biopuce. Ces essais n'ont pas montré de réponse spécifique. Une dernière série d'analyses incluant un pré-traitement des échantillons au détergent BRIJ afin de lyser les vésicules extracellulaires et obtenir les tétraspamines sous forme libre en solution a été réalisée (65). Ainsi les VEs purifiées ont été incubées avec du BRIJ à 0,5% final durant 30 min (dilution 1:1 v:v). La réponse SPRi observée lors des analyses de VEs traitées au détergent a été attribuée à un signal non-spécifique entraîné par le détergent lui-même (voir **Figure 73**). En conclusion, aucune réponse SPRi spécifique n'a pu être obtenue à ce jour lors de l'analyse des « vésicules extracellulaires » produites sur cellules MDCK sur le modèle de biopuce SPRi multiplexée réalisé.



VII.6.4. Conclusions et perspectives

Les outils analytiques développés à ce jour pour les VEs sont dédiés à la caractérisation des VEs issues de lignées cancéreuses à des fins diagnostiques (228–230). En termes de bioprocédés, les VEs représentent cependant une source potentielle de contaminants d’origine cellulaire (ADN, ARN et protéines) (227). Les analyses TRPS réalisées nous ont permis de valider la présence de VEs dans les échantillons de surnageant purifié. Bien que la productivité cellulaire en particules virales soit supérieure à celle en VEs de trois ordres de grandeur pour la lignée MDCK, la présence de ces contaminants n’est pas négligeable. Une caractérisation plus approfondie des VEs produites serait intéressante dans notre cas. D’une part une caractérisation biologique et morphologique par microscopie électronique et immuno-marquage associée à la cytométrie en flux, nous permettrait de décrire la population de vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules MDCK. D’autre part, une analyse protéomique des échantillons de VEs purifiées nous permettrait potentiellement d’identifier de nouvelles cibles membranaires pour la réalisation d’analyses SPRi.

Plusieurs pistes permettent d’expliquer les difficultés rencontrées pour mettre au point une détection des VEs par SPRi multiplexée. Dans un premier temps, la concentration en VEs des surnageants de cultures MDCK apparaît inférieure aux concentrations « physiologiques » des fluides corporels humains (sang, urine, plasma), où ils sont retrouvés à des concentrations de 10^8 - 10^{10} VEs.mL⁻¹, et aux concentrations évaluées pour la lignée HEK293 (224,227). La lignée MDCK peut donc être qualifiée de lignée « peu productrice » de VEs. Ainsi, étant donné que les limites de détection évaluées pour d’autres tests SPR qui sont généralement de l’ordre de 10^8 - 10^9 VEs.mL⁻¹ et pour des temps d’analyse/de résidence de l’ordre de l’heure (230), il est envisageable que la limite de détection de notre biopuce soit supérieure à la concentration en VEs des échantillons testés. Ensuite, les anticorps polyclonaux utilisés ont uniquement été validés par immunomarquage et en conditions dénaturantes et n’ont potentiellement aucune affinité pour les marqueurs membranaires en conformation native. Il serait nécessaire de revalider les anticorps utilisés par Western Blot sur les échantillons de VEs purifiées, voir de réaliser un criblage par SPR de différents anticorps commerciaux validés et utilisés pour la détection de vésicules extracellulaires en solution (par exemple des anticorps monoclonaux validés par des

analyses SPR/ELISA/FACS). La lyse des vésicules avant analyse nous était apparue pertinente afin de supprimer une éventuelle limitation par le transfert de masse visible dans les précédents travaux à ce sujet (140,230), cependant Picciolini et al. ont déterminé une perte de signal SPRi basé sur l'utilisation d'anticorps anti-CD9 après pré-traitement des échantillons d'exosomes au détergent (238). Un point bloquant pour l'obtention de tests sensibles basés sur la SPR et l'utilisation d'anticorps anti-tétraspanines semble être la densité surfacique de marqueurs membranaires relativement faible à la surface des VEs (de l'ordre de 40 CD/EVs) par rapport à la densité surfacique de HA à la membrane du virus (230). Il a récemment été évalué l'utilisation de peptides ciblant la membrane des VEs comme alternative ou complément aux ligands ciblant des marqueurs membranaires protéiques qui permettrait de palier à cette limitation (239).

VIII.

DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION D'UN DISPOSITIF SPRi EN-LIGNE POUR L'ÉVALUATION DES CINÉTIQUES DE PRODUCTION VIRALES

VIII.1. Introduction

Ce chapitre détaille le développement d'un dispositif dédié à l'analyse *en ligne* des cinétiques de productions virales de cultures cellulaires en suspension. Il est présenté sous la forme d'une publication scientifique intitulée ***Real-time at-line monitoring of influenza virus in cell culture by a surface plasmon resonance biosensor***. Nous allons prochainement soumettre ces travaux dans la revue ***Biotechnology and Bioengineering***.

Nous avons initialement cherché à évaluer le degré de limitation par le transfert de masse obtenu lors de l'analyse de particules virales d'Influenza par le test analytique SPRi précédemment développé (**Chapitre VI**), démontrant la validité de la relation $\left. \frac{dR}{dt} \right|_{t \sim 0} = k_t A_0$. Nous avons également cherché à évaluer la variabilité du diamètre des particules virales produites au cours des cinétiques de productions cellulaires, puisqu'il existe une relation de proportionnalité entre le diamètre et le k_t . Ce travail nous a également permis de valider le test sur différents échantillons de particules virales d'Influenza (souches et plateformes d'expression différentes) afin d'étudier l'impact potentiel de ces paramètres sur la réponse SPRi par l'évaluation du paramètre k_t . Par ailleurs, la spécificité du test SPRi pour la quantification de particules virales bioactives a été évaluée par l'analyse d'échantillons de virus inactivé par la chaleur, en comparaison d'autres techniques de références.

Dans un second temps, nous avons développé une ligne de prélèvement et de purification automatisée pour la réalisation d'un capteur en-ligne dédié au suivi de production de particules virales issues de cultures cellulaires en suspension. Nous avons ainsi pu réaliser une série d'analyses SPRi continue (fréquence : 1 h⁻¹) entre 8 et 54 h.p.i. Ces travaux servent donc de preuve de concept de l'applicabilité du test développé pour l'analyse quantitative en-ligne de particules virales entières et bioactives. Les données supplémentaires correspondent à l'**Annexe 3** de cette thèse. En complément de ce manuscrit est présentée l'évaluation d'un dispositif de filtration tangentielle automatisée dédiée à la purification et la concentration des échantillons de surnageant de culture cellulaire destiné à terme à être inclus dans le dispositif d'analyse en-ligne développé.

VIII.2. Manuscrit

REAL-TIME AT-LINE MONITORING OF INFLUENZA VIRUS IN CELL CULTURE BY A SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR

Laurent Durous^{1,2}, Blandine Padey², Aurélien Traversier², Caroline Chupin², Thomas Julien^{2,3}, Loïc J. Blum¹, Manuel Rosa-Calatrava^{2,3}, Christophe A. Marquette¹, Emma Petiot^{1,4}

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

² VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

³ VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

⁴ CPE Lyon, Bâtiment Hubert Curien, 43 bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France

KEYWORDS: Influenza virus; At-line sensors; Process Analytical Technology (PAT); Surface Plasmon resonance (SPR); Viral production process

ABSTRACT:

Since the early 2000', regulation agencies encourage viral vaccine manufacturers to implement in-process and real-time monitoring tools in production processes. Even if an increasing number of assays has been recently developed for viral particles quantification, none of these technologies are able to monitor virus levels and production kinetics within the cultivation bioreactors. Thus, vaccine manufacturers still rely on off-line cell-based infectivity assays or antigen content evaluation to monitor upstream/downstream processes. The present study describes the development of the first automated biosensor for at-line monitoring of influenza virus production, by coupling a fetuin-based SPRi quantitative biosensor with an automated cell culture sampling and a clarification set-up (acoustic filter).

The impact on the SPRi response of different viral strain and cell production platforms was evaluated. We thus demonstrated that fetuin-based quantitative SPRi is a robust, potency-indicating and universal analytical technology for the quantification of bioactive influenza virus particles in both purified and complex matrices. The outcome was then the integration of the specificities of each viral strain as well as the impact of the production cells (ratio IVP/VP, particle morphology). Finally, influenza viral production kinetics were monitored *at-line* over 3 days within a suspension cell culture process. It was then clearly demonstrated that the developed on-line tool enabled the real-time access to the quantification of total viral particles and to the evaluation of the cell specific productivity.

1. Introduction

Recent years have seen the development of several cell culture-based influenza vaccine production processes (22). Such processes are interesting alternatives to the historical split-inactivated vaccine produced by ovoculture (12,22,240) and within these processes, those based on suspension cell culture represents one of the most promising strategy for large-scale influenza vaccine bioprocesses (25,32,241).

In parallel, FDA's Process analytical Technology (PAT) and Quality by Design (QbD) guidance from 2004 pushed manufacturers to use more on-line technologies to monitor both the critical process parameters (CPP) and the bioproduct's critical quality attributes (CQA) within their processes. Thus, several on-line or in-line probes were recently implemented to monitor CPP. Viable cell concentrations were monitored thanks to capacitance probes (242–245) whereas cell nutrients and by-products were analyzed by Near-Infrared or Raman Spectroscopy (246,247). More recently, capacitance and fluorescence probes were also implemented to monitor infected cells along the bioprocesses, unlocking the access to the production kinetics of various viruses (109,113,248,249). Although such tools bring new insight on the viral production processes, they still require intensive calibration and do not provide yet information on the viral particle or antigen content, nor an evaluation of the bioactivity of the produced virus. Here, biosensors can be real assets with their capacity to specifically detect biologically active products. Nevertheless, their implementation in bioprocesses for in-process monitoring remains limited. The sole examples available in the literature concerns at-line monitoring of either bioactive recombinant protein or mAbs in culture process by Surface Plasmon Resonance (SPR) (200–202).

When it comes to the virus production domain, the tedious cell-based infectivity assays (TCID₅₀ and plaque forming unit (pfu) assays) are still the routine virus quantification methods for both upstream (USP) and downstream (DSP) viral production processes. Such assays present high variability (118) and a weekly basis to provide results, irrelevant as PAT tools and real-time analysis several physical quantification techniques (e.g. TRPS, NTA, FFF-MALS, flow virometry) were developed and evaluated to reach in-process monitoring of the viral particle. These techniques are capable of virus particle counting through optical or conductimetry measurements (114). They are appropriate to be

implemented at-line for in-process evaluation of the viral particle levels as they allow for counting particles in less than an hour (114). Nevertheless, none of them was installed on-line since they all require sample handling and only provide limited information on virus bioactivity. This is two major drawbacks regarding the implementation of tools for influenza viral production process development and optimization. Here again, biosensors and particularly SPR-based quantitative biosensors shall be real assets capable of evaluating bioactive virus concentrations, especially when no standards are available, which is commonly the case for vaccines or early-phase biotherapies (195,197). SPR-based assays were thus evaluated for the detection and quantification of various bioactive forms of influenza strains (65,102,157,250). It is also interesting to note that an increasing number of publications presented SPR-based quantitative assays applied to the analysis of a wide variety of bioactive molecules as well as applications in the bioprocess monitoring field (195,197,202,234).

In one of our previous studies, a proof of concept was made for influenza vaccine and virions quantification (from MDCK-based production) thanks to a fetuin-based SPRi quantitative assay, showing that the developed system has similar or even better performances than other techniques used for viral particles quantification (157). In the present study, the applicability of the analytical system was extended to other production platforms (egg, adherent MDCK, and suspension avian DuckCelt®-T17) and evaluated off-line at different stage of purification for several influenza strains. The aim was to demonstrate the fetuin-based SPRi quantitative assay broad applicability for bioactive influenza virus quantification in various influenza vaccine bioprocesses.

Finally, the fetuin-based SPRi quantitative biosensor developed for on-line monitoring of influenza bioproduction was integrated in an automated sampling and pre-treatment line in order to monitor influenza virus production kinetics in real-time within the suspension cell culture.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Fetuin from fetal bovine serum, bovine serum albumin, ethyl dimethyl carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), sodium dodecyl sulfate (SDS), polysorbate 20, trypsin acetylated from

bovine pancreas were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium acetate buffer and ethanolamine-HCl were acquired from Brucker Daltonics (Hamburg, Germany). Phosphate Buffer Saline (PBS) tablets, Pluronic F-68 (P1300) and trypsin (T6763) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). NuPAGE™ LDS buffer was from Thermofischer. All solutions were prepared using milliQ water. Oseltamivir carboxylate was purchased from Roche (Bale, Switzerland). Madin–Darby canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL34), serum-free Ultra-MDCK, EMEM and Optipro SFM cell culture media, L-glutamine and penicillin/streptomycin solutions were obtained from Lonza (Amboise, France). Avian DuckCelt®-T17 cell lines (ECACC 09071703) were acquired from Transgene. SRID reference antigens were acquired from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

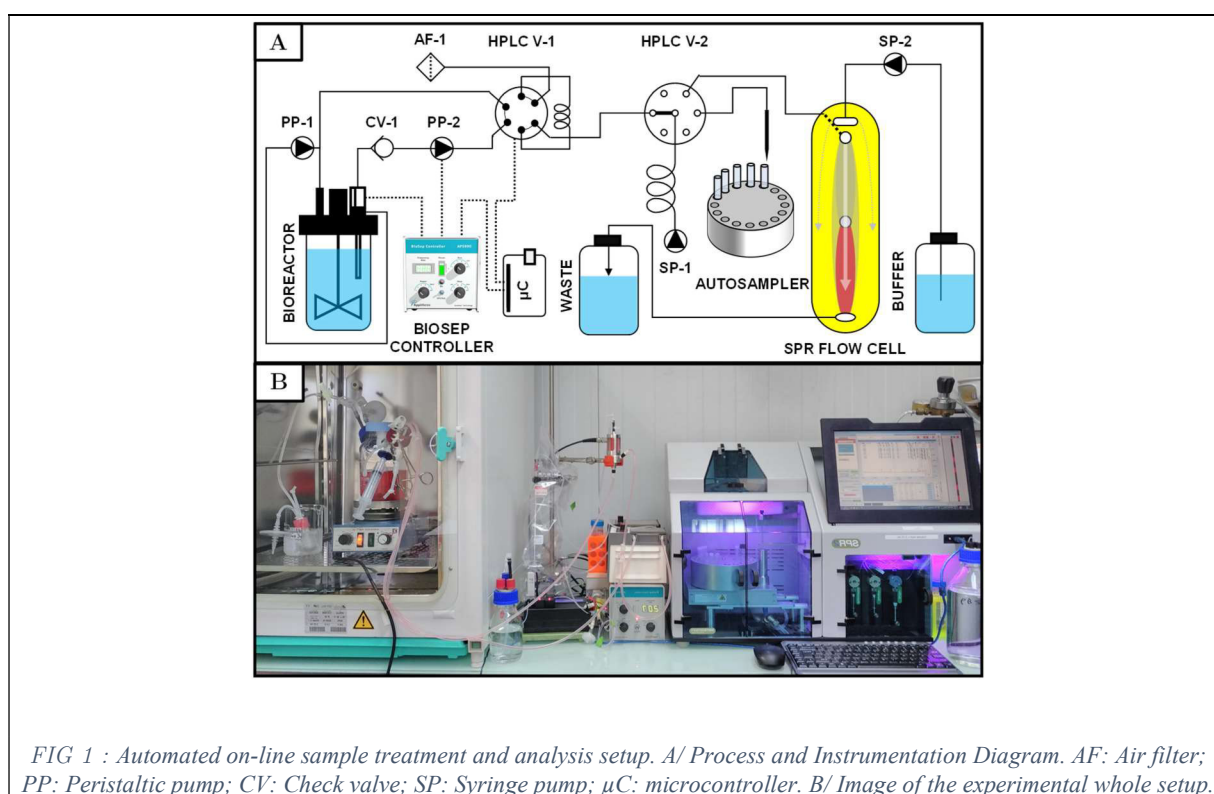
2.2. Influenza virus production

Three influenza A subtype were produced on either MDCK or DuckCelt®-T17 : A/California/07/2009 (H1N1), A/Reassortant/NYMC X-179 (H1N1) and A/Panama/07/99 (H3N2). MDCK cells were grown in 175 cm² T-flasks in Ultra-MDCK serum-free medium supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin and streptomycin (100 U/mL). At 70-80% of confluence, influenza viruses were inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 10⁻³ virus/cell. Cell culture were collected every day and further clarified using 2000g centrifugation for kinetics analysis. DuckCelt®-T17 cell were grown in suspension and in Optipro SFM medium supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL) and 0.2% (w/v) Pluronic F-68. Prior to virus production, DuckCelt®-T17 cells were seeded at 0.7.10⁶ cell/mL and amplified to reach between 0.8.10⁶ and 1.4.10⁶ cell/ml before infection. Infection was performed at a multiplicity of infection (MOI) of 10⁻³ virus/cell in the presence of 0.5 µg/mL trypsin. Productions for *off-line* evaluation were run in 500 mL shaker flasks at 37 °C in a CO₂ Kühner incubator (ISF1-X, Kühner) with agitation speed of 120 rpm. *At-line* experiments were achieved thanks to the connection of the SPRi equipment to a 500 mL Bellco spinner flask located in the CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂, 120 RPM). Monitoring of cell growth and viability was performed every two hours through manual sterile sampling.

2.3. SPri at-line setup

2.3.1. Automated sampling and pre-treatment line

The automated sampling and pre-treatment line set-up is presented in **FIG 1**. Sampling and clarification were achieved with a Biosep 10L acoustic filter (Applikon Inc., Foster City, CA) connected with two peristaltic pumps (P-1, GE Healthcare) used for medium circulation and sample withdrawal (211). Recirculation flow rate was settled to 6 mL/min and harvest pump flow rate to 2 mL/min (10 min harvest time every 20 min) in order to fill an HPLC valve loop with 500 μ L sample volume. The HPLC sample loop and was switched by I/O communication with a microcontroller board running a home-made script (*Supplementary Information 3*). The syringe pump of the SPri was used for sample diafiltration by suction/discharge before filling of dedicated vials within the autosampler according to a modified script.



2.3.2. SPRi quantitative assay and bioactive virus concentration determination

Imaging Surface Plasmon Resonance (SPRi) quantitative assay was performed using the SPR-2 instrument from Sierra Sensors. The method was the previously described one with minor modifications (157). Both sensing and reference surfaces were functionalized with immobilized fetuin (200 µg/mL, pH=4.5). Then, the reference surface was treated with bacterial neuraminidase (2.5 U/mL) in order to cleave -2,3, α -2,6 or α -2,8 terminal sialic acid linkages. Clarified cell culture samples were collected every hour thanks to the automated sampling and pre-treatment line and injected into the SPRi autosampler. SPRi autosampler vials were combined *in situ* with oseltamivir carboxylate to reach a final concentration of 10 µM. 80 µL samples were then injected in duplicates into the SPRi flow cell at flow rate of 40 µL/min, leading to a 2 min interaction time. Running buffer for all experiments was composed of PBS containing in addition 0.05% (v/v) of Tween 20 and 10 µM oseltamivir carboxylate. Surface regeneration was performed by injection of 25 µL of PBS buffer containing in addition 0.25% (v/v) of SDS. Initial binding rates [RU/s] were calculated by linear regression of the response during the whole association phase, corresponding to mass transport limitation (MTL) conditions (195). A moving average filter (n=3) was applied for data smoothing on on-line production kinetics.

2.4. Infectious viral particles (IVP) determination

Infectious titers of influenza samples (IVP/mL) were evaluated by plaque forming units (PFU) assays (116). Confluent MDCK cells cultivated in 6-well plates were infected with serial dilutions of virus performed in EMEM medium. 800 µl of viral suspensions were deposit on the cell monolayer and incubated 1 h at 37 °C under continuous shaking. MDCK cells were then washed with EMEM medium and overlaid with Nobel agar (1.1%) mixed 1:1 with modified MEM composed of 2x MEM, 200 U/mL of penicillin-streptomycin and 2 µg/mL of trypsin. Infected cell cultures were incubated for 3 days at 37 °C, 5% CO₂ before visual inspection of cytopathic effect.

2.5. Total particles (TP) determination by TRPS

Total particles were quantified by Tunable resistive pulse sensing technique (TRPS) using qNano Gold (IZON Science, Lyon, France). Samples were diluted at 1/5 in PBS buffer before analysis. Analyses

were performed using thermoplastic polyurethane membranes with a size-tunable nanopore of 150 nm (NP150). Calibrations were performed using carboxylated polystyrene beads standards (CPC150, Izon Science Ltd., Lyon, France) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Quantification of Hemagglutinin (HA) antigen

2.6.1. Hemagglutination assay for potency evaluation

The HA titers of clarified and heat-denatured supernatant samples were quantified by hemagglutination assay in v-bottom 96-well plates as previously described (251). Aliquots of 50 μ l were serially diluted 1:2 in PBS. They were further incubated for 1 hour at room temperature with 50 μ l of 0.5% chicken red blood cells (RBCs). Then, HA titers were evaluated as followed: the last dilution presenting hemagglutination was transposed as the HA units/50 μ l. Relative HA content presented in the graphs were evaluated as the ratio of HA titers and expressed in %.

2.6.2. HA protein content by Western Blot (WB) densitometry

HA protein content was analyzed thanks to quantitative western blot densitometry. Clarified viral production supernatants were incubated with LDS lysis buffer supplemented with dithiothreitol 0.1 M, and heat-denatured for 5 min at 95 °C. Samples were then loaded onto a 10% SDS-PAGE gel for migration and later transferred on a nitrocellulose membrane. Western blot analysis were performed using universal anti-hemagglutinin antibody cocktail (F211-10A9 and F211-11H12, 6 μ g/mL) as primary antibodies set provided by NRC-Montreal laboratory incubated overnight at 4°C (96). Anti-mouse HRP secondary antibody (1/5000 dilution) was incubated 1 hour at room temperature. Densitometry of WB bands was analyzed thanks to the Image Studio software (LICOR Biosciences, Lincoln, NE).

3. Results and discussion

3.1. Mass-transport limitation evaluation for bioactive influenza virus particles

We initially sought to determine the major determinants of the SPRi response when sensing influenza virus particles (VP) in order to evaluate the robustness of the methodology. For SPRi biosensors

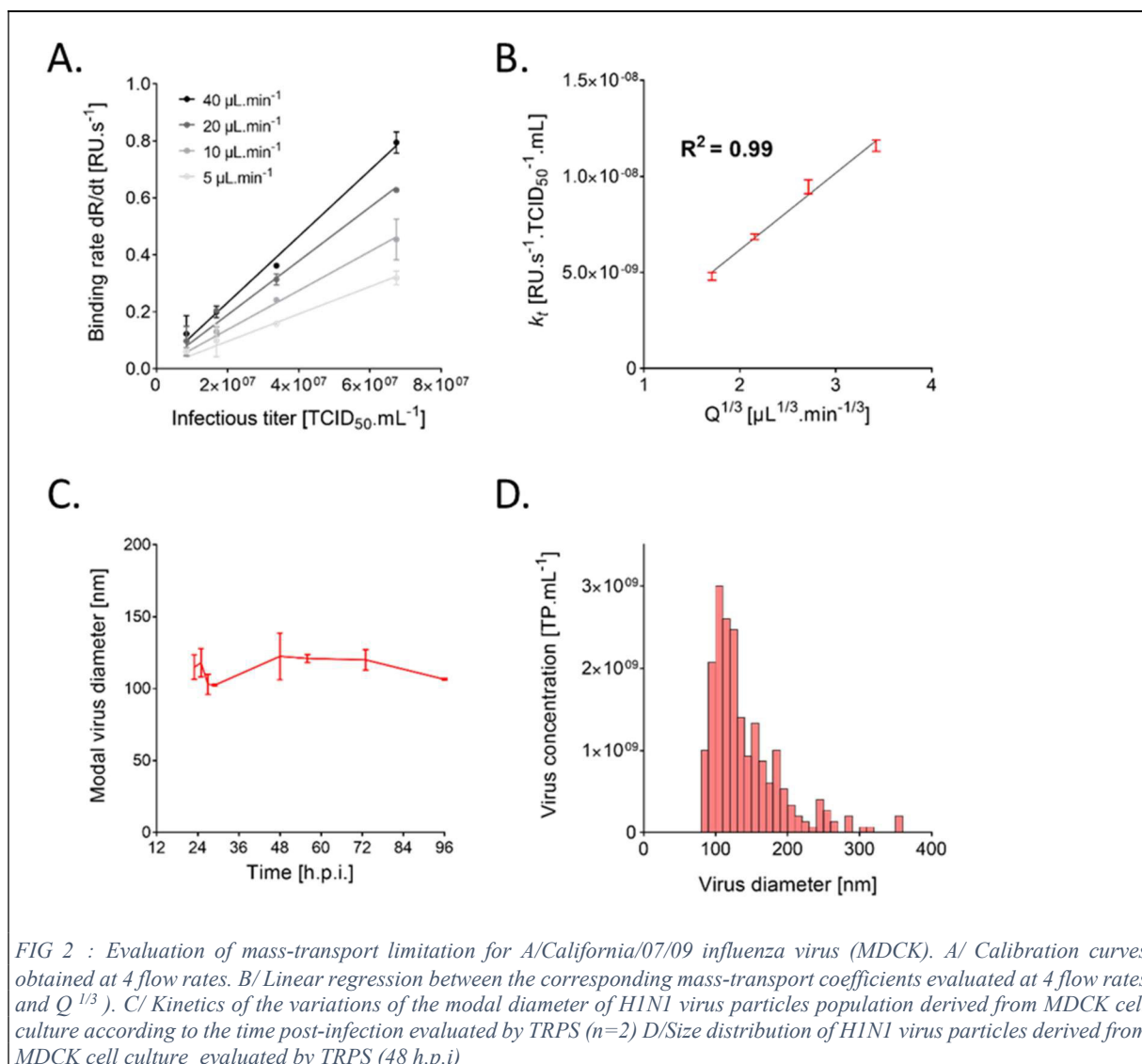
operating under mass-transport limitation (MTL) conditions, binding rate (dR/dt) shall be directly correlated to the analyte bulk concentration according to the following equation (195,197) :

$$dR/dt = k_t \times A_{bulk} \sim d_{virus}^{7/3} \times Q^{1/3} \times A_{bulk} \text{ [equation 1]}$$

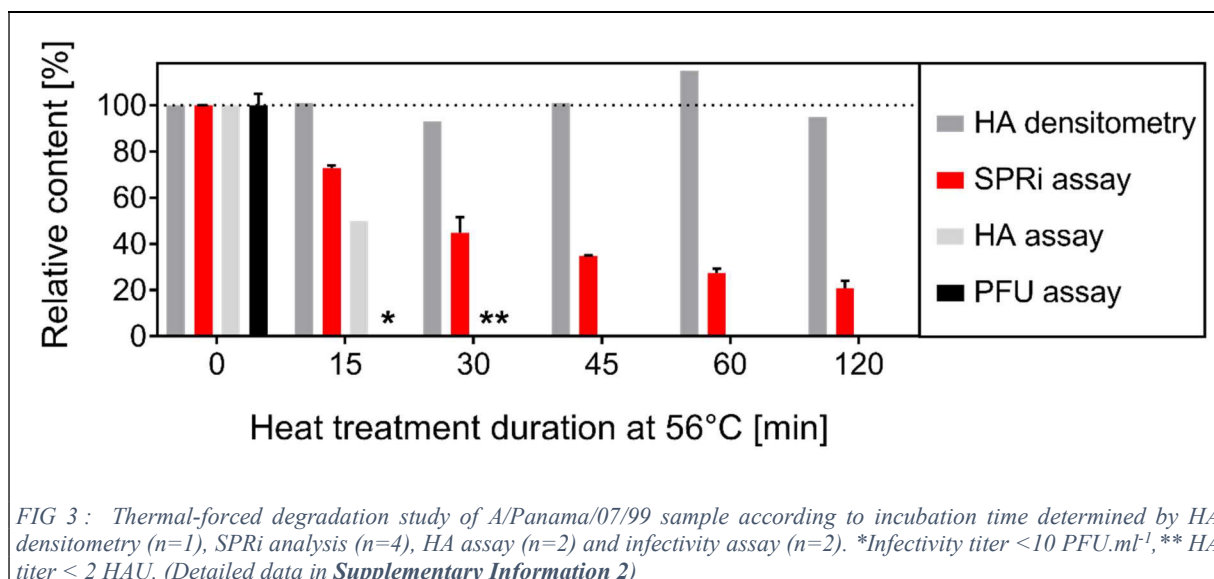
Where k_t [RU.s⁻¹.VP⁻¹.mL] is the mass transport coefficient, A_{bulk} [VP.mL⁻¹] corresponds to analyte bulk concentration, Q is the operating flow rate and d_{virus} the virus diameter (see equation simplification in **Supplementary information 1**). The binding rate of influenza particles has already been demonstrated to be linearly correlated with total virus particles content in mass-transport limitation conditions (157). Indeed, viruses are large macromolecular entities which diffuse slowly ($D \sim 5.10^{-12}$ m².s⁻¹) (125) to biosensors' surface making them particularly suitable for SPRi quantitative analysis.

In order to confirm that the fetuin-based SPRi biosensor operates under full mass-transport limitation conditions for the determination of bioactive virus concentration, H1N1 influenza virus samples produced in MDCK cell culture ($6.8.10^7$ TCID₅₀.mL⁻¹) were serially diluted and processed at four different flow rates (5, 10, 20 and 40 µL.min⁻¹). The slopes of the curves obtained allow us to determine the mass transport coefficient k_t at different flow rates (**FIG 2.A**). The good correlation ($r^2 = 0.99$) obtained between k_t values (which corresponds to the slope of calibration curves $dR/dt = f(A_{bulk})$) and $Q^{1/3}$ at different flow rates (**FIG 2.B**) validates our methodology and confirmed that influenza virus binding to the surface is fully mass transport limited.

Because variations in virus particle diameter are well known (252) to have an impact on the mass transport coefficient, the size variations of the viral particles all along the production process had to be evaluated. The size of H1N1 influenza virus population produced on MDCK cells culture was then measured over the duration of a 96 hours production by tunable resistive pulse sensing (TRPS) analysis. The influenza virus population was shown to be monodisperse with a quasi-gaussian diameter distribution around 114 ± 8.3 nm (RSD = 7.3%) (**FIG 2.C**). A negligible evolution of the virus particle diameter during the production process was then demonstrated (**FIG 2.D**), proof that the SPRi-based direct quantification using k_t values can be used as a robust at-line virus particle detection tool.



Thermal-forced degradation studies were performed to validate that the present SPRi biosensor has the potential to selectively detect bioactive virus particles (i.e. carrying bioactive HA antigens). As depicted in **FIG 3**, the SPRi assay was used to characterize heat-treated virus degradation after increasing inactivation times. As can be seen, the developed biosensor was able to follow a time-dependent decrease of the virus bioactivity. These observations are coherent with the evaluation of HA potency performed using SRID or other stability-indicating techniques (85,91,253), and demonstrate that the SPRi assay can be employed for both stability monitoring and in-process monitoring of whole virus samples.



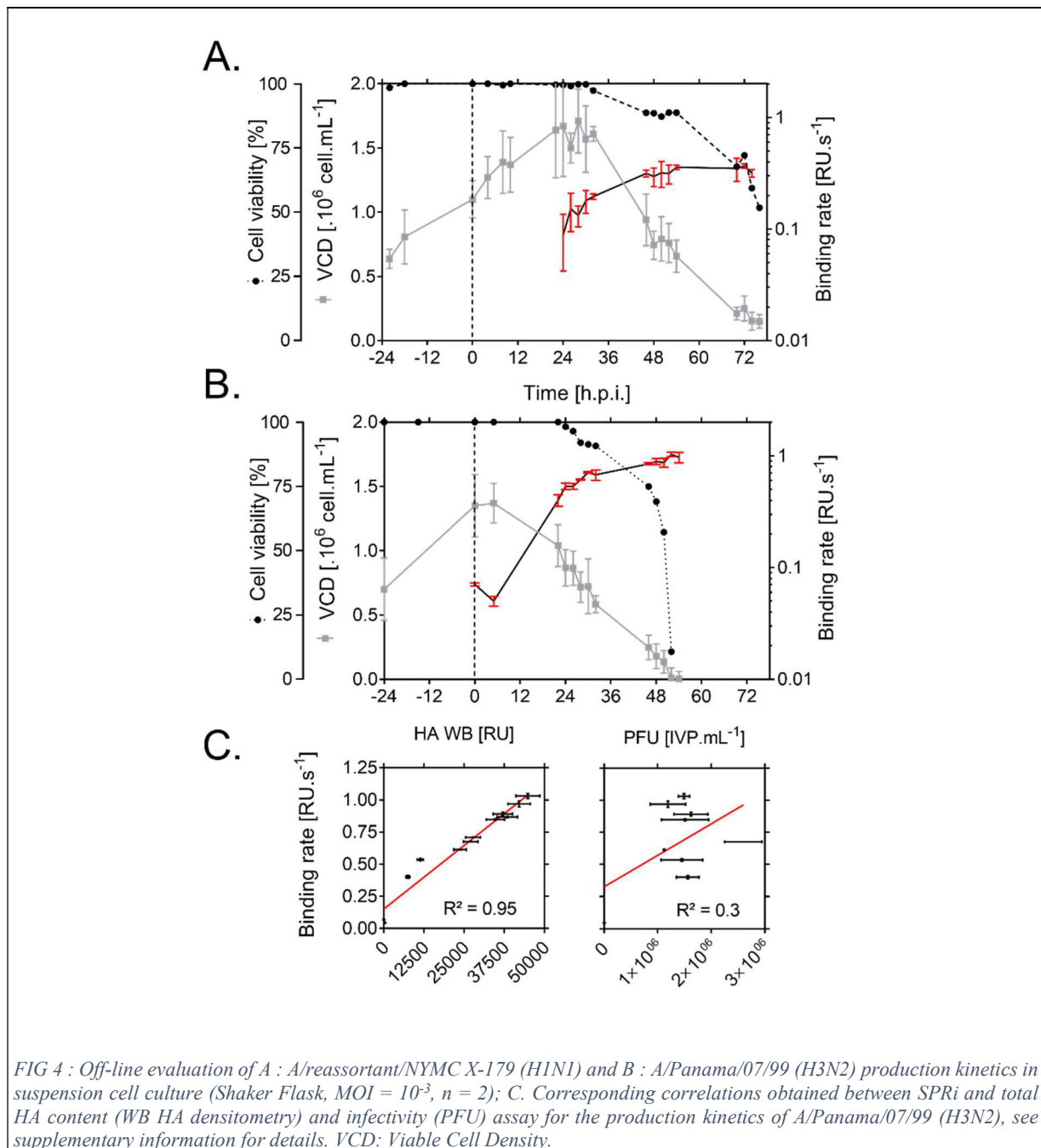
3.2. Off-line quantification of bioactive influenza virus particles

Using SPRi initial binding rate as an analytical parameter was then applied to the monitoring of influenza production kinetics in avian suspension cell (Duckcellt-T17) for two different influenza strains, H1N1 and H3N2. This production strategy was selected, first to consolidate data acquired in a previous study for MDCK adherent cell, and then to be used as a model for the ongoing development of suspension cell-based production strategies (25,32,241).

Characteristic production profiles for H1N1 and H3N2, monitored by pfu infectivity assay and followed using SPRi initial binding rate values are presented in **FIG 4.A** and **B**, respectively. For both influenza strains, characteristic influenza production and growth profiles were obtained. 24 hours of cell growth allowed to reach the target cell concentration at infection (CCI) between 1 and 2 x 10⁶ cell/ml. Indeed, such cell density aims to avoid already described “cell density effect” and to infect within the optimal cell concentration range to reach maximal viral production in batch mode (32,108,254). Then, after infection at low multiplicity of infection (MOI : 10⁻³), cell display a prolonged cell growth of 1 day. Simultaneously to the viral release, monitored by SPRi binding rate values, cell death appears with a clear drop of cell viability 24 hours post-infection (h.p.i.) and a loss of total viable cells.

According to previous production in Duckcellt-T17 cell line described in Petiot et al., 2018, H1N1 and H3N2 viral particles are commonly released as soon as 24 hours post-infection (h.p.i.) and production

last over 2 to 3 days. In the present case, cell death observation and monitoring of production thanks to SPR analysis confirm such kinetics. Indeed, production trends and maximal production levels are similar to the ones obtained in previous work with this cell line and titers reached were comparable to titers reached in previous studies and with other suspension cell platforms (108,236,241) with about 1.5×10^5 PFU.mL⁻¹ at 24hpi for H1N1 strain.



As for the SPR monitoring tool, the present results demonstrate that traditional infectivity (PFU) assays are poorly correlated ($R^2=0.3$) with the bioactive virus quantification (**FIG 4.C**). This has already been

described in several cell-based production studies and correspond to a degradation of infective virus particles when production phase last over several days (32,108,157,236) (28,255). Such biological degradation impact the infectious/total particles ratio which evolves over the culture duration as described in Frensing, et al. 2015 and our previous study (Durous et al., 2019). Here, SPRi-based quantitative response correlated better ($R^2=0.95$) to the total antigen level of a production (**FIG 4.C**). Altogether, these results demonstrate the interest of using fetuin-based SPRi quantitative assays instead of infectivity assays for virus bioprocess monitoring, as vaccine manufacturers ultimately desire to evaluate their processes in terms of total bioactive viral particles (i.e. particles carrying bioactive HA antigens). Our SPRi assay is thus suited for both production monitoring, potency and stability evaluation of whole virus preparations, particularly for whole inactivated virus or virus-like particles-based vaccines for which infectivity assays are not applicable (34).

3.3. At-line monitoring of bioactive influenza virus during production processes in suspended cell culture

In order to evaluate the feasibility of on-line viral production kinetic monitoring using the developed SPRi biosensor, an automated sampling and pre-treatment line was established. The complete setup used for automated cell culture monitoring is detailed in **FIG 1.A**. Briefly, DuckCell T17 suspension cell culture was grown in a 500 ml spinner flask installed in a standard CO₂ incubator. Culture was sampled and clarified thanks to a Biosep acoustic filter every hour. Following clarification, samples were directly injected in SPRi autosampler.

The developed biosensor was implemented at-line to monitor the production of bioactive virus particles through the measurement of initial binding rate at fetuin modified SPRi surface. At-line automatic sampling of cell culture was performed every hour. The targeted production was an H3N2 virus produced at an MOI of 0.001 virus/cell and from cell culture infected at 0.8×10^6 cell/ml.

In order to validate the auto-sampling and auto-clarification line, a cross validation with manual sampling and standard clarification (centrifugation) was performed. To do so, SPRi analysis were realized in parallel on cell-culture supernatants derived from the same production batch using both

manual and automated system. The obtained data demonstrated a very satisfying correlation ($R^2=0.92$) between off-line and at-line SPRi response, validating then the auto-sampling system (**FIG 1.A**).

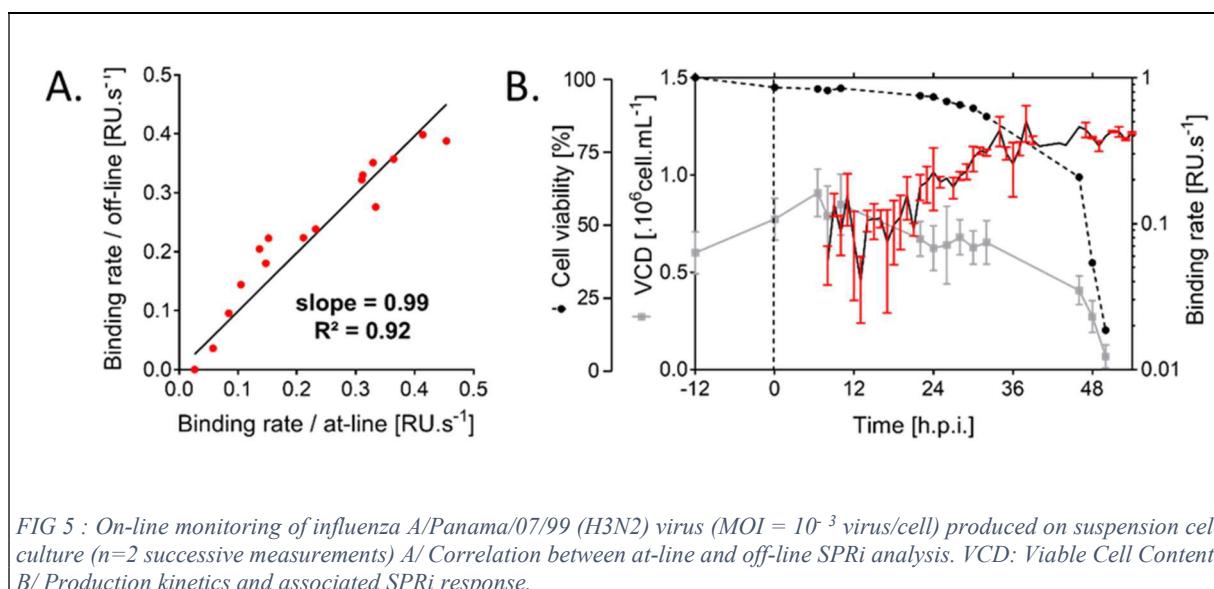


FIG 5 : On-line monitoring of influenza A/Panama/07/99 (H3N2) virus ($MOI = 10^{-3}$ virus/cell) produced on suspension cell culture ($n=2$ successive measurements) A/ Correlation between at-line and off-line SPRi analysis. VCD: Viable Cell Content. B/ Production kinetics and associated SPRi response.

Finally, the production kinetics are presented on **FIG 5.B**. The developed biosensor enabled us to access for the first time to bioactive influenza virus production kinetics in real-time. Cell growth and death profile are consistent with previous production performed with H3N2 viral strains on this specific cell line Duckcellt-T17 (see section 3.2 FIG 4.B). Cell death is appearing from 24 hours post-infection confirming the infection process is on-going with a concomitant drop in viable cell number. Binding rate trends is similar to the one observed in figure 4.B for the H3N2 influenza strain production. The real-time monitoring of influenza binding allows for an increased knowledge of our production kinetics. Indeed, sampling rate on preliminary off-line study presented in figure 4 were intentionally increased to obtain a wide range of viral particle concentration over the production process. Nevertheless, standard sampling rate for influenza titration are commonly once a day (29,32,108,236). For example, such sampling rate and complexity of sample processing evaluate viral productivity does not allow to access to early production phase and to describe infection cycles occurring in cell-based processes optimized at low MOI. In the present case, sampling rate of every hour allow for an early monitoring of virus release as well as the potential monitoring of viral infection cycle considering they commonly last about 8 to 10 hours (249). As a matter of fact, important binding rate variations (34%RSD in average) were obtained within the first 24 hours post-infection. This part of the process corresponds to the phase where

the bioactive particle concentrations are very low. Thus, such variability is most probably due to the limit of detection of the biosensor which is at 5.3×10^5 PFU/ml as described in our previous paper (Durous et al., 2019). Then from 24hpi the SPRi response variability decrease (mean RSD=12%). A drop in the binding rate is observed at 12hpi and could correspond to a process phase between two cycles of infection. As previously described for other cell lines, several successive infection cycles are necessary to reach 100% of cell population infected and cell death (249).

These results present the first available technology for real-time monitoring of bioactive influenza virus particles and influenza production processes. It is applicable on both adherent and suspension cell culture thanks to automated sampler specifically designed in-house. There is a clear discrepancy between binding rate and standard infectivity assay, indicating total particle count should be more indicative a process dynamic and productivity. Our results will need to be further validated with reference quantification of total viral particles in order to establish correlation of SPR binding with any viral particle produced from several cell platform and various influenza strains (H1N1, H3N2 and B).

4. Conclusion

In this work, we developed and evaluated a fully automated SPR assay for the monitoring of bioactive influenza virus particles produced in suspension cell culture that has potential to expedite process development. We showed that, unlike immunoassays, the SPR response does not depends on the virus strain or expression platform. This, in combination with the fact it does not requires specific reagents, makes it particularly interesting for the quantitative evaluation of early-batch productions of emerging strains of influenza virus that represents a potential bottleneck for actual technologies in the case of a pandemic event. Additionally, the next step to follow in order to evaluate this technology as a potential alternative to SRID would be to establish direct correlations between the SPRi response obtained with whole virus preparations and their immunogenicity (33).

Glycan-based quantitative SPR appears to be the only technology that is capable of rapid, precise and universal quantification of influenza bioactive virus particles without the need of specific reagents, and can relatively easily be transposed on other SPR platforms. We hope our concept proof will bridge the

gap from traditional chemometrics monitoring toward the development of cell culture monitoring biosensors. Regarding actual developments in the field of cell culture-based influenza vaccine manufacturing, our results confirm that the main critical quality attribute to focus on is the concentration of bioactive total viral particles in cell culture. The combination of SPR monitoring with recent orthogonal techniques evaluating total particles (e.g. TRPS, NTA, flow virometry) appears us to be the needed tools that can drive vaccine process developments, because, unlike infectious particles, total viral particles are correlated with total antigen content. The ultimate step regarding PAT implementation one could achieve with this technology in the future would be a coupling with the developed models of virus cell culture production kinetics in order to set up a feedback control loop in continuous cell culture bioprocesses (103).

Acknowledgements & Competitive interests disclosure

L. Durous acknowledges the Auvergne Rhône-Alpes Region for his PhD grant (ARC 1 Santé). The authors would like Brucker Daltonics SPR (Sven Malik & Klaus Wiehler) team for their support regarding the SPR-2/4 apparatus and software. We would like to thank Aziza P. Manceur and Amine Kamen for providing universal anti-hemagglutinin antibodies.

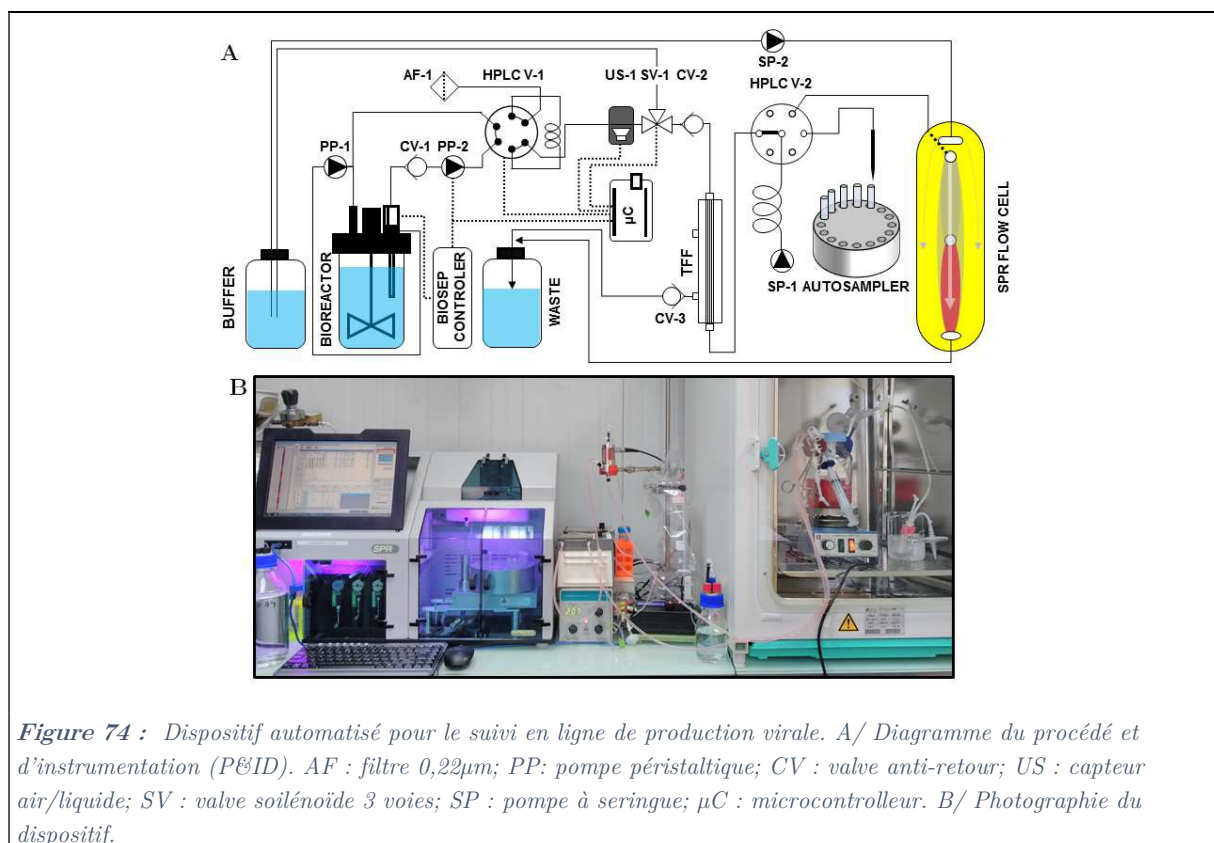
VIII.3. Développement d'un dispositif de filtration tangentielle automatisée

Nous avons pu déterminer que le test SPRi développé présentait certaines limitations afin de permettre un suivi en-ligne robuste des productions virales :

- Sa limite de détection de l'ordre de 5.10^7 particules.mL⁻¹ ne permet pas de réaliser un suivi des cinétiques virales durant leurs phases initiales entre 0 et 12-24 h.p.i.
- Un signal SPRi non-spécifique important peut être induit par des contaminants de différents origines (milieu de culture, contaminants issus de la culture cellulaire, voir **Chapitre VI**)

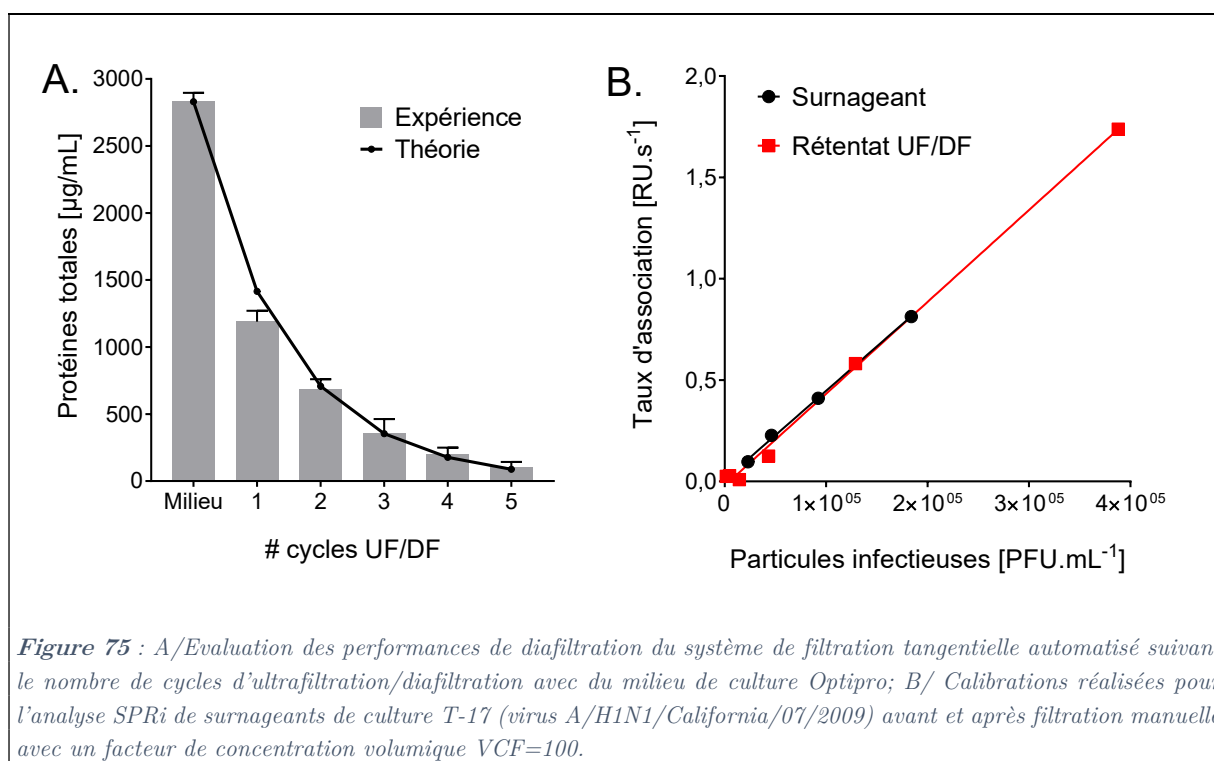
Afin d'étendre le domaine d'application et la robustesse de la technique de quantification proposée ici, nous avons développé et évalué un dispositif de filtration tangentielle automatisée dédiée à la purification et la concentration des échantillons de surnageant de culture cellulaire. En effet, la filtration tangentielle pour réaliser une diafiltration a déjà démontré des rendements de purification proche de 100% et reste une technologie simple à transférer lors d'étapes de mise à l'échelle (*scale-up*) (256,257). Par ailleurs, cette technique offre dans le même temps la possibilité de concentrer et diafiltrer les échantillons, ce qui permet potentiellement de répondre aux deux limitations de la SPRi décrites précédemment. Ce dispositif est destiné à être couplé à la ligne de purification à la suite de l'étape de clarification des échantillons par filtration acoustique. Cette ligne complète de prélèvement et purification automatisée comprend le module de filtration tangentielle destinée à la purification et la concentration des échantillons (voir Matériel & Méthodes : **V.8.4**) et est détaillée dans la **Figure 74**.

Nous avons en premier lieu cherché à évaluer les performances du dispositif de filtration tangentielle (Module Microkros 750 kDa, Spectrum Labs) pour la diafiltration et la concentration de virus influenza. Le dispositif développé a été décrit dans la partie **V.8.4**.



En premier lieu, nous avons évalué l'impact potentiel des cycles d'ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) sur la réponse SPRi. L'objectif étant de pouvoir évaluer des cinétiques de productions virales de manière automatisée sur du matériel concentré et purifié avec un biais analytique réduit (du fait d'un rendement de purification <100% et/ou d'une perte de l'intégrité structurale/l'infectivité des particules virales). Une concentration et diafiltration manuelle d'un échantillon de virus (souche A/H1N1/California/07/2009 produit en cellules T-17) a été réalisée avec un facteur de concentration volumique VCF=100. Les échantillons (surnageant, rétentat et filtrat) ont ensuite été quantifiés par dosage d'infectivité (PFU). Puis des analyses SPRi ont été réalisées sur le surnageant de culture (avant TFF) et le rétentat afin d'évaluer l'impact de l'UF/DF sur la réponse SPRi (voir **Figure 75B**). Nous avons validé que la filtration tangentielle réalisée n'entraîne pas de perte significative en termes de particules virales bioactives, rejoignant des études précédentes (257,258). En effet, les coefficients de transfert de masse évalués sur le surnageant de culture et le rétentat ne diffèrent pas significativement ($k_t = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ RU} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{PFU}^{-1} \cdot \text{mL}$). Cette observation est cohérente avec le taux de cisaillement relativement faible ($\dot{\gamma}_0 = 113 \text{ s}^{-1}$) évalué aux parois du module de filtration tangentielle dans les conditions d'opération (voir **Annexe 3**), qui apparaît peu dommageable envers les particules virales enveloppées.

Par la suite, nous avons cherché à évaluer les performances du module pour la diafiltration de surnageants de culture. Comme il a été décrit en **V.8.4**, la cassette de filtration a été ensuite connectée à la pompe à seringue de l'appareil SPR-2 afin de réaliser une diafiltration de manière automatisée par cycles d'aspiration/refoulement d'un volume donné d'échantillon (voir **Figure 60**). Nous avons évalué la diafiltration de milieu de culture Optipro par un même volume de tampon PBS en fonction du nombre de cycles d'aspiration/refoulement par dosage des protéines totales des échantillons de rétentat collectés dans le passeur d'échantillon de l'appareil à l'aide de la méthode BCA. Nous avons pu évaluer ainsi une bonne correspondance entre les concentrations en protéines totales évaluées et la concentration théorique attendue suivant la relation $C_{éch.} = C_{init.} \times \left(\frac{1}{2}\right)^{n_{cycles}}$, en fonction du nombre de cycles d'ultrafiltration/diafiltration n_{cycles} (voir **Figure 75A**). Cette configuration offre par exemple la possibilité de diminuer d'un facteur 32 la concentration en protéines totales en réalisant 5 cycles d'UF/DF.



VIII.4. Conclusions générales et perspectives

Nous pouvons présenter les conclusions générales et les perspectives de ces travaux selon plusieurs points, détaillés ci-dessous :

Concernant l'évaluation de l'impact des variables physico-chimiques sur la réponse SPRi

Les calibrations réalisées pour caractériser la réponse SPRi obtenue lors de l'analyse de particules virales nous ont permis d'évaluer des coefficients de transfert de masse k_t . Nous avons alors cherché à déterminer quel(s) attribut(s) de la particule virale influence(nt) la valeur de k_t afin d'évaluer leur variation au cours de la culture cellulaire. L'évaluation analytique réalisée a montré les relations de proportionnalité suivantes : $k_t \sim Q^{1/3}$ et $k_t \sim d_{\text{virus}}^{7/3}$ lors de l'analyse de virus en conditions MTL. Nous avons alors pu démontrer la validité de la relation $k_t \sim Q^{1/3}$ lors de l'analyse de particules virales, ce qui indique l'obtention de conditions de limitation par le transfert de masse totale lors des analyses SPRi réalisées. Par ailleurs, nous avons évalué par TRPS que la population de particules virales offrait une distribution de taille unimodale avec une variation de 7% des diamètres (modal et moyen) de la population de particules virales au cours d'une cinétique de production virale en cellules MDCK. Des analyses TRPS complémentaires sont prévues (mars 2020) afin d'évaluer la distribution de taille et la concentration en particules totales de différents échantillons (antigènes de référence NIBSC, virus de différents sous-types, issus de différents hôtes cellulaires) pour lesquels ont été réalisés des calibrations SPRi. Les objectifs seront ici : a) d'évaluer si la réponse SPRi obtenue en conditions de limitation par le transfert de masse totale est indépendante des paramètres cinétiques du couple ligand-HA lors de l'analyse de virus entier, b) d'évaluer les distributions de tailles des différents sous-types analysés et l'impact potentiel sur la valeur du coefficient de transfert de masse déterminé en termes de particules virales totales (k_t [RU.s⁻¹.TP⁻¹.mL]).

Concernant l'utilisation du test SPRi développé comme test alternatif pour le dosage d'activité de production de particules virales totales

Nous avons précédemment validé que le taux d'association dR/dt était proportionnel à la quantité de particules virales totales (**Chapitre VI**). Nous avons ici pu également valider que

ce taux était proportionnel à la quantité de HA totale. Dans les deux modèles cellulaires (MDCK et T-17) utilisés pour les productions virales, le taux d'association n'est cependant pas corrélé à la concentration en particules virales infectieuses. Par ailleurs, le test SPRi développé permet une évaluation de l'activité virale dans des échantillons de surnageants de cultures non purifiés avec une sensibilité et une reproductibilité supérieure au test HA. Ces résultats indiquent que la SPRi quantitative est un candidat potentiel en tant que dosage d'activité vaccinale alternatif à la SRID dans les procédés de productions vaccinaux.

Concernant les cinétiques de production virales évaluées en culture cellulaire aviaire en suspension T-17

Le test SPRi développé nous a permis d'évaluer les cinétiques de production virales de cultures cellulaires aviaires en suspension. De même que pour les observations réalisées pour les productions en cellules MDCK (**Chapitre VII**), il apparaît un défaut de corrélation entre les titres en particules infectieuses et ceux en particules totales aux cours de la cinétique de production (**FIG. 4C**), ce qui rejoint des observations précédentes (voir **partie II.2.2**).

Les cinétiques de productions évaluées par SPRi pour les productions virales en suspension montrent un profil similaire à celles évaluées pour les productions en cellules adhérentes MDCK. Afin de valider les résultats de la cinétique de production *en-ligne*, des analyses TRPS des surnageants de culture (échantillons prélevés manuellement en parallèle et analysés par SPRi, voir **FIG. 5B**) vont prochainement être réalisés. Ces données permettront également de calibrer le signal SPRi obtenu en termes de particules totales et d'évaluer des taux de productivité cellulaire ($q_{p,virus}$ en [TP.cell⁻¹.h⁻¹]). Ces taux constituent un paramètre d'intérêt pour le suivi, le développement et le contrôle des bioprocédés.

Concernant le dispositif de filtration tangentielle automatisé

L'ultrafiltration/diafiltration basée sur des modules de filtration tangentielle à fibres creuses est une technique particulièrement intéressante pour la purification de particules virales avant analyse SPRi. La configuration du dispositif automatisé mis au point est par ailleurs non recensée dans la littérature. En effet, cette technique permet d'atteindre des facteurs de concentration volumique élevés et permet dans le même temps une diafiltration de l'échantillon avec des

rendements de purification élevés. Le système développé est adaptable à tout bioréacteur et permet un prélèvement, une purification/concentration et un acheminement des échantillons au niveau du passeur d'échantillon de l'appareil SPR-2 de manière stérile et sans perte d'échantillon.

Il nous apparaît cependant nécessaire de valider d'avantage la ligne de TFF automatisée pour permettre son utilisation future en combinaison avec la méthode d'analyse SPRi développée. L'étape à suivre est l'évaluation de la TFF en mode automatisé pour la concentration de surnageants de production virale d'influenza, afin de comparer le facteur de concentration volumique avec l'augmentation de la réponse SPRi (validation de la relation $FCV = \frac{dR/dt_{\text{Rétentat}}}{dR/dt_{\text{Surnageant}}}$). Le volume de prélèvement maximal étant limité par le volume de la boucle HPLC pour le système automatisé, il est possible d'augmenter le volume de cette dernière pour gagner en sensibilité (ex : $V_{\text{HPLC}} = 2 \text{ mL}$ pour $V_{\text{Rétentat}} = 200 \text{ }\mu\text{L}$: $VCF = 10$) dans une gamme raisonnable par rapport à la fréquence d'analyse et au volume de culture du bioréacteur.

Une pré-diafiltration de l'échantillon avant analyse SPRi est particulièrement intéressante puisque : a) l'impact de la matrice de l'échantillon (pH, force ionique, stringence) est important lors d'analyses biologiques, et la réalisation d'analyses SPRi dans un tampon défini offre une même matrice pour les échantillons et améliore potentiellement la précision des analyses ; b) elle permet d'appliquer la technique SPRi à l'éventail croissant de procédés/milieus de culture qui induisent potentiellement un niveau élevé de signal non-spécifique (22). Par ailleurs, la possibilité de pré-concentrer l'échantillon avant analyse permettrait de gagner en sensibilité et donc de pouvoir réaliser un suivi quantitatif de production virales en début de production lors des premiers cycles d'infection (<24 h.p.i.).

IX.

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse a été développé un test analytique basé sur la SPRi pour la quantification d'hémagglutinine et de particules virales d'influenza (**Chapitre VI et VIII**). Nous avons ainsi pu démontrer que la **SPRi quantitative permet de quantifier des particules virales totales et bioactives**. En cela, elle constitue la seule technique analytique développée à ce jour applicable au suivi en-ligne d'activité des procédés de production vaccinaux. Par la suite, nous avons également cherché à développer des modèles de biopuces SPRi dédiées à la caractérisation des relations structure-activité des formulations vaccinales et à la quantification de contaminants de type « vésicules extracellulaires » au sein de la culture cellulaire (**Chapitre VII**). Afin de pouvoir réaliser un suivi en-ligne des procédés de production virale dédiés à la production vaccinale, une ligne de prélèvement et de purification automatisée de cultures cellulaires en suspension a été réalisée (**Chapitre VIII**). Cette ligne de prélèvement a été couplée avec l'appareil SPR-2 sur lequel a précédemment été développé le test SPRi quantitatif. Le modèle cellulaire choisi pour réaliser une preuve de concept du suivi en ligne de production virale était la lignée cellulaire aviaire en suspension DuckCellt-T17 évaluée précédemment au sein du laboratoire Virpath (**Annexes**).

Sur le plan de l'évaluation de la réponse SPRi pour l'analyse quantitative de particules virales entières :

Nous avons confirmé l'intérêt de réaliser des analyses SPRi quantitatives des particules virales en conditions de limitation par le transfert de masse sur la base du taux d'association initiale :

- Ce paramètre est directement proportionnel à la concentration de particules virales totales en solution en conditions de limitation par le transfert de masse ($dR/dt = k_t A_0$). Ce qui permet l'obtention directe de corrélations linéaires avec des gammes analytiques larges et des corrélations basées sur un paramètre unique : k_t (contrairement au modèle logistique à 4 ou 5 paramètres).
- Le haut poids moléculaire des particules virales d'influenza induit une limitation par transfert de masse quasi-totale lors des analyses SPRi, démontrée par la validité de la relation $k_t \sim Q^{1/3}$ (**Chapitre VIII**). La multivalence des interactions entre la particule virale et la surface présentant des glycanes entraîne une dissociation nulle en présence d'un inhibiteur de NA, ce qui facilite l'évaluation du taux d'association (et limite la perte d'activité de la surface).

- Pour des densités surfaciques de ligand élevées, k_t devient constant et indépendant de la densité surfacique de ligand et des paramètres cinétiques du couple analyte-ligand (**Chapitre VII**), contrairement à la réponse évaluée en point final à l'équilibre (Req). Cette caractéristique est avantageuse pour le développement de test SPRI quantitatifs robustes.

Des analyses de particules virales totales (TRPS) ont été planifiées afin de quantifier et d'évaluer la distribution de taille des populations de particules virales retrouvées dans les différents échantillons évalués (réactifs de référence NIBSC, surnageant de culture de production de virus H1N1 et H3N2 réalisées en cultures MDCK et T-17). Ces dernières permettront d'évaluer la robustesse du test par la détermination des k_t pour ces différentes souches/lignées cellulaires. En effet, k_t dépend du diamètre de la particule virale susceptible de varier selon les souches et plateformes d'expression. La présence d'agrégats au sein des échantillons, susceptibles de biaiser les analyses, pourra également être évaluée par TRPS.

Sur le plan des performances analytiques évaluées :

La reproductibilité évaluée pour le test analytique (~3% CV) est meilleure que celle évaluée pour les techniques analytiques dédiées à la quantification de HA ou de particules virales entières (infectieuse ou totales) (**Chapitre II : Tableau 5** et **Tableau 8**). La sensibilité du test, évaluée pour la quantification de vaccin ($\text{LOD} = 40 \text{ ng HA.mL}^{-1}$, 100 fois inférieure à la SRID), le classe comme une des techniques analytiques alternatives à la SRID les plus sensibles.

La gamme analytique offerte par la SPRI quantitative est large, ce qui a par exemple permis de réaliser un suivi de l'ensemble des cinétiques de productions évaluées sans pré-dilution de l'échantillon. Une pré-dilution de l'échantillon apparaît recommandée dans le cas où la limite de détection du test n'est pas limitante, puisqu'un effet matrice, classiquement rencontré lors d'analyses SPR, peut influencer la réponse en conditions MTL (la viscosité de la solution influence le coefficient de diffusion).

Par ailleurs, un avantage majeur de l'utilisation de la SPRI quantitative pour le suivi des productions d'influenza est sa capacité à quantifier spécifiquement la HA active/les particules virales exposant des trimères de HA actifs. Nous avons validé cette caractéristique par l'analyse

de HA monomérique recombinante inactive (**Chapitre VI**) et la réalisation d'une étude de stabilité d'échantillon de virus inactivé par la chaleur (**Chapitre VIII**).

Sur le plan de l'établissement de dosages d'activité alternatifs et du suivi des bioprocédés vaccinaux dans le cadre de la stratégie PAT :

Comme il a été vu dans le chapitre II, **l'établissement de la SPR comme une technique alternative à la SRID pour le dosage d'activité des productions vaccinales doit passer par l'établissement de corrélations directes entre la réponse SPRi et l'efficacité vaccinale**. A partir du test développé dans cette étude, il serait intéressant de réaliser des études d'immunogénicité vaccinale en modèle animal sur la base de doses quantifiées par SPRi, en antigène vaccinaux dans le cas des vaccins inactivés, ou bien en particules virales totales et bioactives dans le cas de vaccins vivants atténués. En effet, cette étude permettrait de déterminer si la technique SPRi offre une meilleure évaluation de l'efficacité vaccinale par comparaison aux analyses de références utilisées à l'heure actuelle (test HA et SRID). Par ailleurs, l'utilisation d'une protéine glycosylée en tant que ligand pour le test SPRi, la fétuine, **supprime l'étape de génération annuelle des lots de sérums de référence souche-spécifique nécessaire pour la SRID**, qui reste l'une des étapes critiques du procédé de production de vaccin influenza (voir **Chapitre I**). Pour aller plus loin, le dosage d'activité par SPRi pourrait permettre, s'il est validé par les instances réglementaires et qu'il répond à la quantification d'un CQA, ne pas nécessiter de réactifs de référence spécifique à chaque nouvelle souche si les kt évalués pour différentes souches virales n'apparaîtraient pas significativement différents. Cet élément reste à valider à la suite des dosages TRPS de lots de virus produits pour différentes souches.

Aussi, le test analytique SPRi développé nous a permis de réaliser un suivi des cinétiques de production virales d'influenza dans deux lignées cellulaires, pour différentes souches virales d'influenza (virus H1N1 et H3N2) et pour des échantillons de différents degrés de pureté (surnageant de culture, échantillons purifiés, échantillons de vaccin commercial, réactifs de référence de la SRID). Ces résultats indiquent que le test est robuste et applicable de manière universelle aux procédés de production alternatifs basés sur la culture cellulaire en cours de développement. Ce test s'applique tout particulièrement pour les procédés où les dosages

d'infectivité classiques ne sont pas applicables tels que les procédés basés sur la production de particules pseudo-virales (VLP). Puisque ce test permet de quantifier des particules totales et actives, il n'est pas biaisé par le ratio entre les particules virales « totales » (TP) et les particules infectieuse (IVP), contrairement aux dosages d'infectivité ou aux dosages d'acides nucléiques.

La sensibilité du test SPRi semble cependant limitée à ce jour pour un suivi potentiel des cycles d'infection virale durant la phase initiale de production virale (8-24 h.p.i.). Le couplage du dispositif de filtration tangentielle automatisée à la ligne de prélèvement permettrait de réaliser une pré-concentration des échantillons avec un facteur de concentration volumique constant et d'abaisser la limite de détection du test par ce même facteur.

Comme il a été vu dans le Chapitre III, une implémentation complète de la stratégie PAT pour le suivi des particules virales totales et bioactives au sein des procédés de production nécessiterait la mise en place d'un rétrocontrôle en couplant le biocapteur SPRi à des modèles prédictifs après avoir réalisé une évaluation des paramètres critiques du procédé influençant la productivité cellulaire en particules virales. Cet objectif nous paraît peu réaliste à l'heure actuelle. Cependant, l'outil analytique développé pourrait être utilisé pour la détection de déviations du procédé de production (par exemple, une perte d'activité des productions par dénaturation de la HA à la suite d'une acidification du milieu de culture).

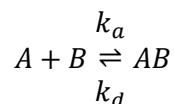
Enfin, un grand nombre de pathogènes (virus, bactéries) présentent un mécanisme d'infection basé sur une interaction glycane-protéine, et présentent donc une affinité/avidité élevée pour certains glycanes ou protéines glycosylées. La SPRi quantitative apparaît être un outil applicable de manière générique au suivi de concentrations bioactives en particules virales totales au sein des bioprocédés de production vaccinaux.

X.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Modèle d'interaction 1:1 et analyse de la réponse SPR(i)

Le modèle classiquement utilisé pour décrire les cinétiques d'interaction biomoléculaires est le modèle 1 : 1 (ou modèle de Langmuir) :



Où A est la molécule biologique en solution (aussi appelée analyte) et B constitue le récepteur fonctionnalisé en surface du biocapteur (aussi appelé ligand). Les taux de réactions associés sont décrits par la constante de vitesse d'association k_a [$mol.L^{-1}.s^{-1}$] et la constante de vitesse de dissociation k_d [s^{-1}]. L'association de l'analyte à son ligand donne lieu à la formation d'un complexe dont la vitesse de formation et de dissociation sont décrites par les équations :

$$\frac{d[AB]_{ass}}{dt} = k_a [A][B] \quad [\text{équation 10.1}]$$

$$\frac{d[AB]_{diss}}{dt} = -k_d [AB] \quad [\text{équation 10.2}]$$

Ce qui donne l'équation suivante :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a [A][B] - k_d [AB] \quad [\text{équation 10.3}]$$

Ce modèle postule que la concentration d'analyte libre [A] dans l'environnement proche du capteur avant association est égale à la concentration d'analyte en solution $[A]_0$.

Si l'on exprime la concentration en complexes [AB] en fonction de la concentration en ligand libre $[B]_0$:

$$[AB] = [B]_0 - [B] \quad [\text{équation 10.4}]$$

On obtient :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a [A]_0([B]_0 - [AB]) - k_d [AB] \quad [\text{équation 10.5}]$$

Cette équation est une équation différentielle ordinaire (EDO) de la forme $\frac{dx}{dt} = \alpha - \beta x$ avec $\alpha = k_a [A]_0 [B]_0$, $\beta = k_a [A]_0 + k_d$ et $x = [AB]$. La solution est donc de la forme :

$$x(t) = \frac{\alpha}{\beta} - C e^{-\beta t} \quad [\text{équation 10.6}]$$

En condition initiale ($t=0$), aucun complexe analyte-ligand n'a été formé : $x(0) = [AB]|_{t=0} = 0$. On obtient donc $C = \frac{\alpha}{\beta}$. On obtient une solution particulière de l'équation 10.6 :

$$x(t) = \frac{\alpha}{\beta} (1 - e^{-\beta t}) \quad [\text{équation 10.7}]$$

$$[AB] = \frac{[B]_0}{1 + \frac{k_d}{k_a[A]_0}} (1 - e^{-(k_a[A]_0 + k_d)t}) \quad [\text{équation 10.8}]$$

À l'équilibre ($t \rightarrow \infty$), les vitesses d'association et de dissociation du complexe sont égales ($\frac{d[AB]}{dt} = 0$), ce qui permet d'obtenir les constantes d'équilibre K_a et K_d :

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad [\text{équation 10.9}]$$

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad [\text{équation 10.10}]$$

Par ailleurs, d'après 10.8, on obtient l'isotherme d'adsorption de Langmuir :

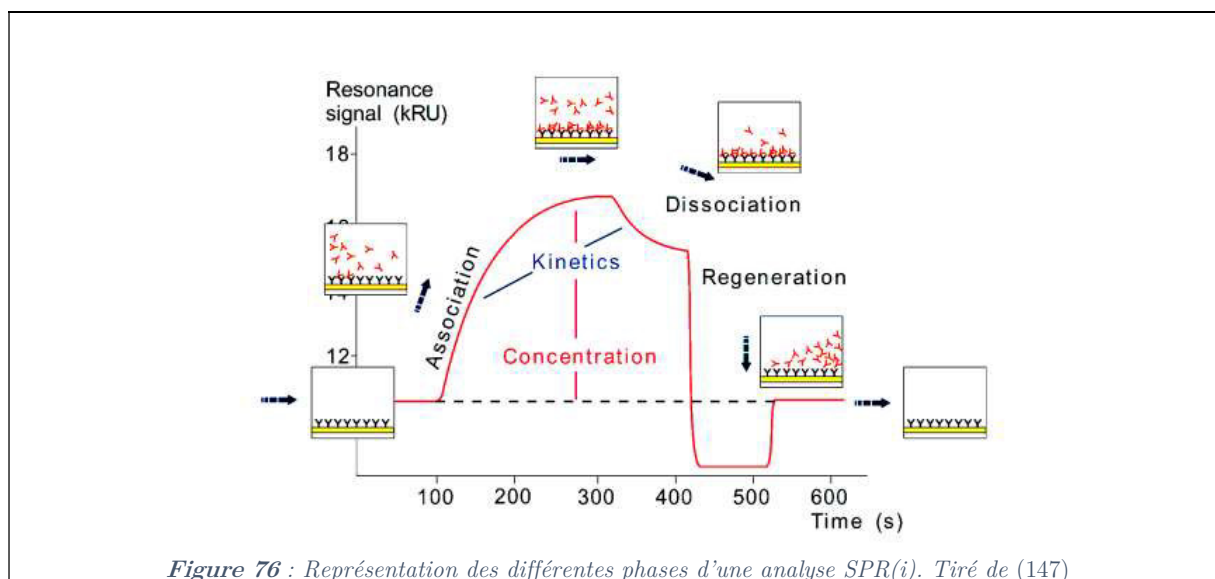
$$[AB] = \frac{[B]_0}{1 + \frac{k_d}{k_a[A]_0}} = \frac{[A]_0 [B]_0}{[A]_0 + K_d} \quad [\text{équation 10.11}]$$

On peut obtenir la fraction d'analyte liée en fonction de $[A]_0$ et K_d dont l'équation décrit une hyperbole. L'équation obtenue est l'équation de Hill-Langmuir pour une liaison non-coopérative :

$$\theta = \frac{[AB]}{[B]_0} = \frac{[A]_0}{[A]_0 + K_d} \quad [\text{équation 10.12}]$$

On voit ainsi qu'à l'état d'équilibre, une concentration $[A]_0 = K_d$ correspond à une fraction d'analyte liée de 50%.

- Les différentes phases de la réponse SPRi:



L'équation 10.5 déduite du modèle de Langmuir permet en règle générale de décrire avec adéquation les interactions biomoléculaires s'opérant lors d'analyses SPR. La **Figure 76** détaille les différentes phases que comporte un cycle d'analyse SPR, le résultat est appelé « sensorgramme ». On distingue plusieurs phases lors d'une analyse :

- **L'état initial**, avant injection de l'analyte, pour lequel la densité surfacique de ligand est $[B]_0$ et aucun complexe analyte-ligand n'a été formé $[AB]|_{t=0} = 0$.
- **La phase d'association**, qui suit l'injection de l'analyte et l'association-dissociation de l'analyte à son ligand fonctionnalisé.
- **La phase stationnaire** : lorsque le temps d'injection de l'analyte est suffisamment long un équilibre est atteint entre le nombre d'événements d'association et de dissociation du couple analyte/ligand. La réponse à l'équilibre est nommée R_{eq} et dépend des constantes d'affinité, de R_{max} et de la concentration en analyte. On retrouve l'isotherme d'adsorption de Langmuir exprimé en fonction de la réponse SPR :

$$\frac{dR}{dt} = k_a [A]_0 (R_{max} - R_{eq}) - k_d R_{eq} = 0 \Leftrightarrow R_{eq} = \frac{[A]_0 K_a R_{max}}{[A]_0 K_a + 1} = \frac{[A]_0 R_{max}}{[A]_0 + K_d} \quad [10.13]$$

- **La phase de dissociation** : se déroule une fois l'injection de l'analyte terminée. La concentration d'analyte en solution tend vers 0 loin de la surface et, conformément à l'équation [3.1], la courbe doit suivre une décroissance exponentielle simple.
- Dans le cas d'analyses multiples en SPR, une **phase de régénération** peut être réalisée à l'aide d'injection de différents tampons, soit en jouant sur le pH, la force ionique ou la stringence de la solution pour favoriser la dissociation du couple analyte-ligand. Cette étape requiert une optimisation afin d'obtenir une régénération totale de la surface sans entraîner une perte d'activité du ligand qui peut subir une dénaturation. Pour pallier ce problème, certaines firmes ou groupes de recherche ont développé des stratégies d'immobilisation réversibles (ex : interaction réversible d'oligonucléotides d'ADN complémentaires dont l'un est couplé à la streptavidine avant injection du ligand biotinylé)

Relation entre signal et densité surfacique :

La réponse obtenue en SPR est décrite en termes d'unités relatives (RU pour *resonance unit* ou *response unit*). Des travaux princeps effectués par Stenberg et al. ont permis d'établir une calibration du système SPR en corrélant la réponse obtenue avec la densité surfacique de ligand radiomarqué (évaluée en ng protéines/mm²) (259). La corrélation obtenue était : $1^\circ \equiv 10 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ (voir **Figure 77A**). Sachant que 1 m° correspond à 10 RU on obtient la relation : $1 \text{ RU} \Leftrightarrow 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ (133). La conversion en unités molaires peut être réalisée en connaissant le poids moléculaire de l'analyte, ce qui permet d'obtenir un nouveau coefficient de transport de masse k_t en $[\text{RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$: $k_t = G \times MW \times k_m$ avec G le facteur de conversion $1 \text{ RU} \Leftrightarrow 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ (197).

Récemment, Rupert et al. ont vérifié que la variation du signal obtenue dans des conditions de limitation par le transfert de masse était cohérente avec la sensibilité de $10^6 \text{ RU} \cdot \text{RIU}^{-1}$ classiquement définie pour le système Biacore (140).

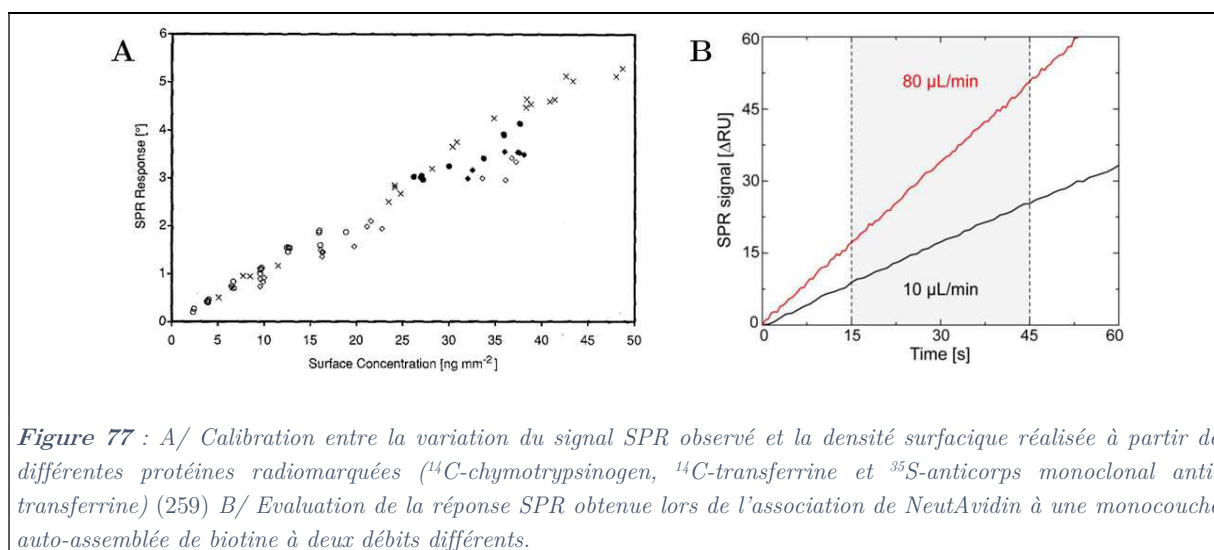


Figure 77 : A/ Calibration entre la variation du signal SPR observé et la densité surfacique réalisée à partir de différentes protéines radiomarquées (¹⁴C-chymotrypsinogen, ¹⁴C-transferrine et ³⁵S-anticorps monoclonal anti-transferrine) (259) B/ Evaluation de la réponse SPR obtenue lors de l'association de NeutAvidin à une monocouche auto-assemblée de biotine à deux débits différents.

ANNEXE 2 : Méthodes de dosage d'activité relative par SPR(i)

Durant les phases finales de développement de biomolécules (par exemple pour les productions vaccinales), le dosage d'activité de l'analyte est simplifié par l'évaluation d'activité relative entre l'échantillon et une référence. L'activité relative peut être définie de la manière suivante : « le ratio de deux doses de même efficacité est un estimé de l'activité de la préparation testée par rapport à celle d'un standard ».

$$\text{Activité relative} = \frac{\text{Dose}_{\text{Standard}}}{\text{Dose}_{\text{Test}}}$$

Cette relation équivaut à : $\log(\text{Activité relative}) = \log(\text{Dose}_{\text{Standard}}) - \log(\text{Dose}_{\text{Test}})$

L'activité relative est déterminée à l'aide de différentes méthodes (ratio des pentes, concentration effectrice/inhibitrice : EC_{50} ou IC_{50} ou enfin analyse des lignes parallèles ou *parallel line analysis* : PLA). Ainsi, par exemple : le dosage d'activité du vaccin influenza par SRID est classiquement évalué via la méthode du ratio des pentes avec comme réponse le diamètre du disque d'immunoprécipitation, mais peut aussi être évalué par PLA (260). Cependant, cette stratégie inclue : a) un biais si les paramètres cinétiques du standard et de l'échantillon sont différents, b) une propagation de l'erreur analytique du titre du standard de référence sur celui de l'échantillon. Les auteurs ont également montré une bonne corrélation entre les valeurs d'activité déterminée par PLA ou EC_{50} et celle déterminée par CFCA (234)

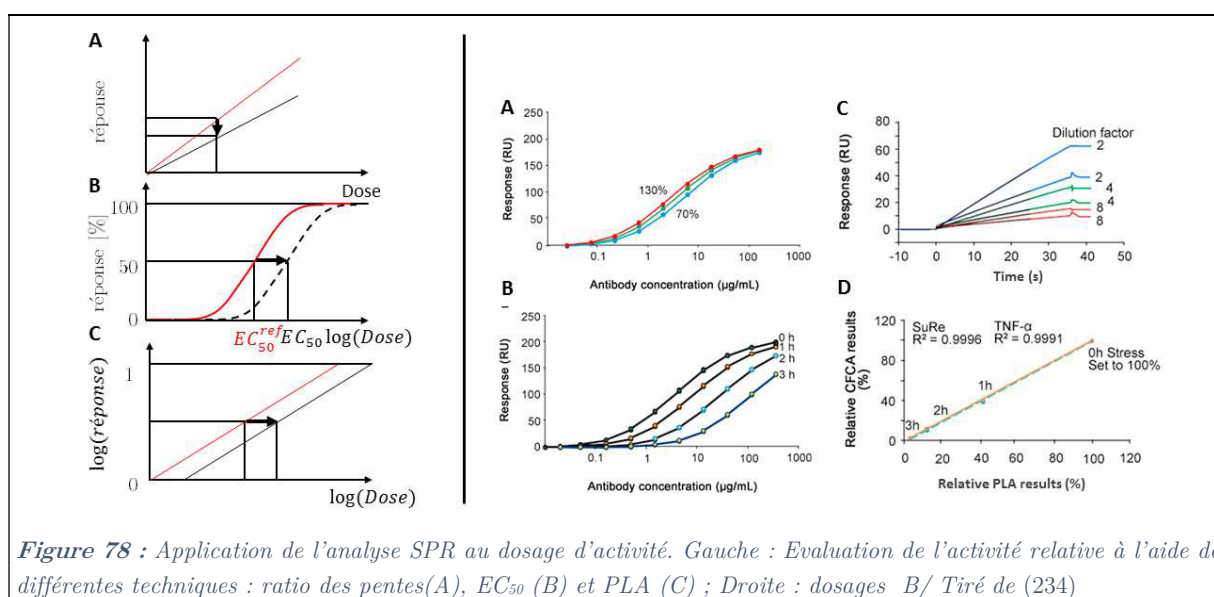


Figure 78 : Application de l'analyse SPR au dosage d'activité. Gauche : Evaluation de l'activité relative à l'aide de différentes techniques : ratio des pentes(A), EC_{50} (B) et PLA (C) ; Droite : dosages B/ Tiré de (234)

ANNEXE 3 : INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE VIII

SUPPLEMENTARY INFORMATION 1 – Evaluation of the impact of virus size variation on the mass transport coefficient k_t

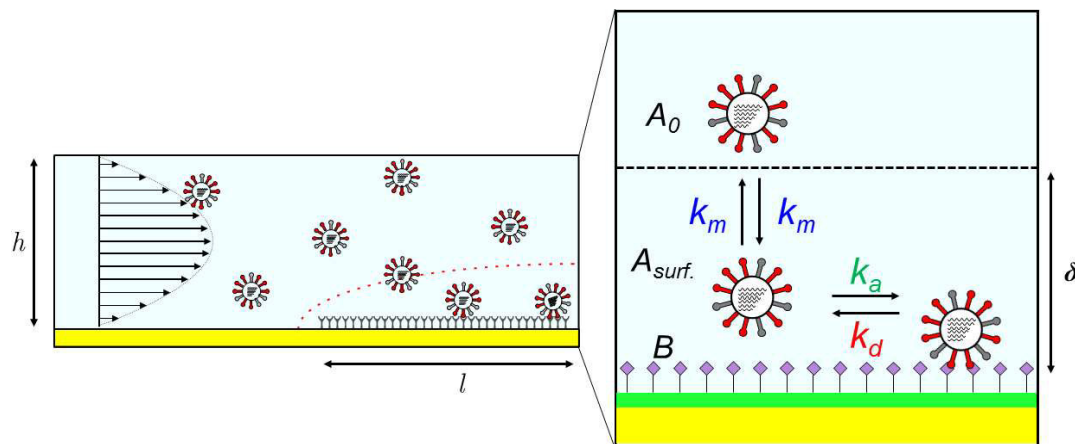


FIG S1 : Schematic representation of the transport of virus particles in the biosensor flow cell

The diffusive flux J [$\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] of an analyte through the depletion zone (δ) of a biosensor is given by (132,261):

$$J = k_m (A_{\text{bulk}} - A_{\text{surf}}) \cdot 10^3 \quad [\text{equation S1}]$$

Where k_m [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] is the heterogeneous mass transport coefficient and A_{bulk} and A_{surf} [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] correspond respectively to the analyte concentrations in the solution and close to the sensor's surface. The factor 10^3 is used as a conversion factor: $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \leftrightarrow \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. For a rectangular flow cell with one sensing wall, the heterogeneous mass transport coefficient has been analytically derived (195,197) :

$$k_m = 0,98 \times \left[\frac{D^2 Q}{h^2 w l} \right]^{\frac{1}{3}} \quad [\text{equation S2}]$$

Where D [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] is the diffusion coefficient of the analyte, Q [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$] the volumetric flow rate and h , w and l [m] respectively correspond to the height, the width and the length of the flow cell. Surface-based biosensors can be operated in conditions of mass transport limitation, where the binding rate of biomolecules to the biosensor's surface is limited by the diffusion phenomenon, predominating over the association phenomenon. Under these conditions, the bulk concentration of analyte is proportional to the initial binding rate $d\Gamma/dt$ according to the relation:

$$\left. \frac{d\Gamma}{dt} \right|_{t \sim 0} \sim k_m A_{\text{bulk}} \quad [\text{equation S3}]$$

Γ [$\text{mol} \cdot \text{m}^2$] being the surface-bound density of analyte. The corresponding response of SPR biosensors (e.g. the initial binding rate in terms of response unit) also takes other parameters into account:

$$\left. \frac{dR}{dt} \right|_{t \sim 0} = k_t \times A_{\text{bulk}} = \text{Slope}_{\text{cal}} \times G \times MW_{\text{viru}} \times k_m \times A_{\text{bulk}} \quad [\text{equation S4}]$$

Where $\text{Slope}_{\text{cal}}$ is a calibration coefficient between the SPR response and the local refractive index variation, G is a conversion factor between the refractive index variation and the mass surface density, and MW_{virus} is the molecular weight of Influenza virus particle (197).

Besides its flow rate dependence ($k_t \sim Q^{1/3}$), k_t depends on constants (i.e. geometric flow cell parameters and conversion factors) and analyte-related parameters (D_{virus} and MW_{virus}).

The size-dependence of the diffusion coefficient of the virus can be evaluated according to the Stokes–Einstein equation:

$$D_{\text{virus}} = \frac{k_B \times T}{3\pi \times \eta \times d_{\text{virus}}} \text{ [equation S5]}$$

Where k_B represents the Boltzmann constant, T the temperature and η the viscosity of the medium. The flow cell temperature was kept constant during all experiments. Buffer viscosity was also considered constant as all samples were diluted in the same buffer (PBST, 10 μ M oseltamivir carboxylate) for calibrations. Additionally, the viscosity of the cell culture medium (Optipro®) was considered identical as the PBST buffer, as no serum was added.

While for the molecular weight of influenza virus:

$$MW_{\text{virus}} = \rho_{\text{virus}} \times V_{\text{virus}} \times N_A = \rho_{\text{virus}} \times N_A \times \frac{4}{3} \pi d_{\text{virus}}^3 \text{ [equation S6]}$$

Where ρ_{virus} represents the density and V_{virus} the volume of the virus particle and

By coupling **equations S4, S5 and S6**, we can deduce the mass transport coefficient is proportional to the virus particle diameter according to $k_t \sim d_{\text{virus}}^{7/3}$.

- **Evaluation of the size variability of Influenza virus particles produced by cell culture**

As k_t depends on virus particle diameter, influenza virus particles pleomorphism and/or size variability during cell culture can influence the SPR response. We evaluated size variations of MDCK cell culture-derived influenza virus population according to the time post-infection by TRPS analysis. Average size distribution of the cell culture-derived Influenza virus population (**FIG S2A**) was obtained by averaging TRPS counts in given size ranges over the whole production kinetic. Cell culture-derived influenza virus population appears unimodal (or “single peaked”) with a mean modal diameter of **114 $\pm$ 8.3 nm** (**FIG S2B and C and**

Table S1). A gaussian fit of the averaged TRPS data yielded a mean peak value of 118 nm (**FIG S2A**), statistically similar as the mean modal diameter. The distribution appears quasi-gaussian with a positive skew.

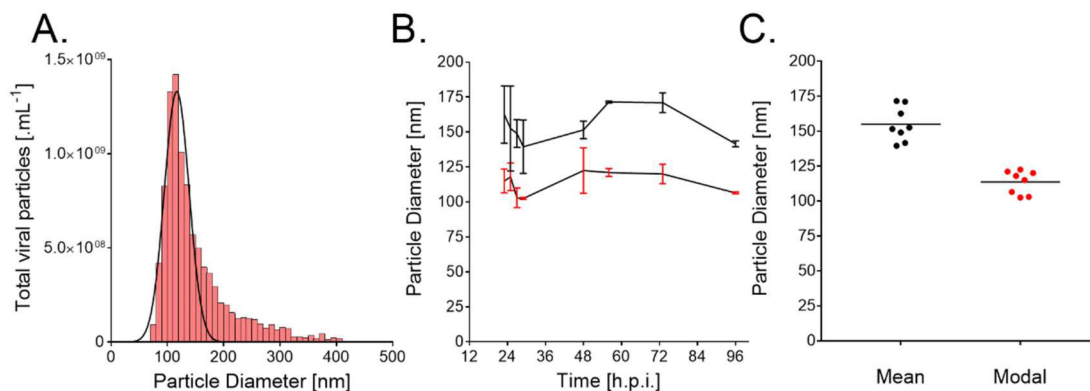


FIG S2 : A/ Averaged size distribution of H1N1 virus particles derived from MDCK cell culture evaluated by TRPS B/ Kinetics of the variations of the mean and modal size of H1N1 virus particles population derived from MDCK cell culture according to the time post-infection evaluated by TRPS (n=2) C/ Corresponding mean and modal diameter of influenza viruses over the production kinetics.

According to **equation S5**, one can evaluate the diffusion coefficient of Influenza virus particles:

$$D_{virus} = \frac{k_B \times T}{3\pi \times \eta_{medium} \times d_{virus}} = \frac{1.38 \cdot 10^{-23} \times 288}{3\pi \times 10^{-3} \times 1.14 \cdot 10^{-7}} = 3.7 \cdot 10^{-12} [m^2 \cdot s^{-1}]$$

Table S1 : Mean and modal diameter evaluated over the production kinetics in MDCK cell culture

	Mean $\pm$ CV	RSD %
Mean Diameter [nm]	155 $\pm$ 12	7.7
Modal Diameter [nm]	114 $\pm$ 8.3	7.3

SUPPLEMENTARY INFORMATION 2 – Evaluation of mass transport limitation conditions for the quantitative analysis of influenza virus particles

• Calibration of the SPR apparatus

Calibration of the SPR-2 apparatus was made by passing glycerol solutions (weighted on an analytical balance and diluted in PBST buffer) of increasing refractive index onto the functionalized sensor and recording ΔRU variations (see **FIG S3**). Considering a 1% w/w glycerol solution yields a refractive index increment Δn_s of 0.00113 Refractive Index Unit [RIU], we evaluated the system response as:

$$Slope_{cal} = \frac{\Delta R}{\Delta n_s} = 7.08 \pm 0.08 \cdot 10^5 [RU \cdot RIU^{-1}]$$

This value is close to the conventional value of $1.0 \cdot 10^6 [RU \cdot RIU^{-1}]$ reported in the literature for commercial SPR systems (207). Additionally, the baseline noise of the response has been evaluated as $\sigma(R) = 0.1 [RU]$. The resolution of the system can be evaluated by the limit of detection $S = 3.3 \cdot \sigma / Slope_{cal} = 5 \cdot 10^{-7} [RIU]$.

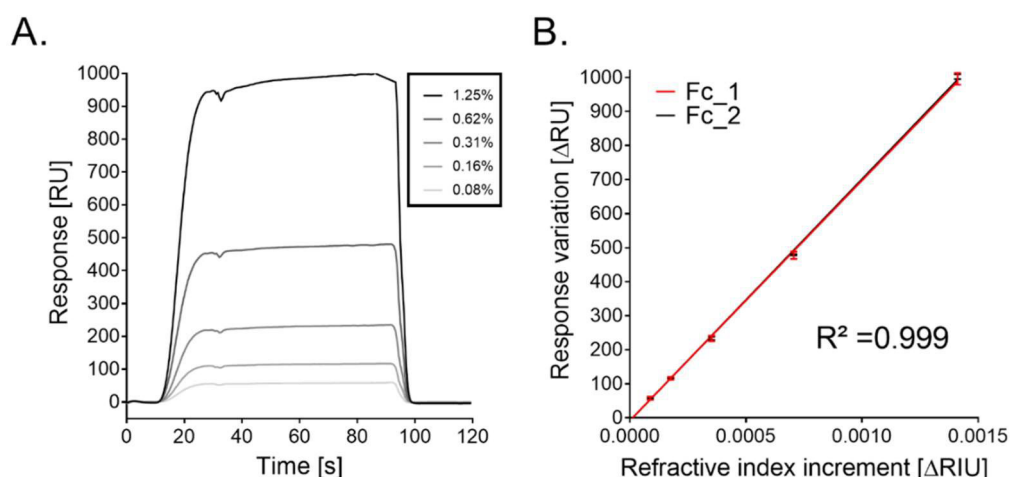


FIG S3 : Calibration of the SPR-2 apparatus. A/Sensorgrams of the response obtained for glycerol solutions of increasing concentrations in PBST buffer B/ Corresponding calibration curves of the response variation according to the refractive index increment of glycerol solutions for the two sensing surfaces (Fc_1 and Fc_2, n=4).

• Evaluation of ligand surface density:

We sought to evaluate the surface density of terminal sialic acid moieties exposed at the surface of our SPR sensor, as ligand surface density appears to have an impact on quantitative SPR analysis (197). Fetuin glycoprotein was covalently grafted on both the sensing and reference surfaces in order to reach a full surface coverage. An enzymatic lysis of terminal sialic acid moieties of the reference surface was achieved by bacterial neuraminidase (157). The signal decrease (ΔRU) during the lysis of reference surface (see **FIG S4**) was converted in terms of RU/kDa and $molecules.mm^{-2}$ according to the mass sensitivity of SPR systems ($1 RU \leftrightarrow 10^{-6} g.mm^{-2}$) and by taking into account the system calibration and the molecular weights of the fetuin (48.4 kDa) and sialic acid moieties (309 Da) (197,259).

The high surface density of sialic acid terminal moieties ($168 \pm 17 RU.kDa^{-1}$) obtained by the covalent grafting of fetuin glycoprotein appears particularly suited for quantitative SPR analysis, as it has been described by Pol et al.(197). Additionally, we evaluated that the fetuin glycoproteins covalently immobilized expose an average number of terminal sialic acid (SA) moieties of $n=3.2$ SA/protein for the binding of influenza virus.

Table S2 : Evaluation of the ligand surface density according to the amount of fetuin immobilized on the reference surface and the signal decrease evaluated during enzymatic lysis (n=3 experiments).

Ligand		Fetuin protein		Sialic acid moieties	
		Value	Mean±SD	Value	Mean±SD
Amount	1	2690	2.5±0.2.10 ³	58	5.2±0.5.10 ¹
Immobilized	2	2300		49	
[ΔRU]	3	2700		49	
Mean Surface density [RU.kDa ⁻¹]		53±4		168±17	
Mean Surface density [molecules.mm ⁻²]		2.2±2.10 ¹⁰		7.2±7.10 ¹⁰	

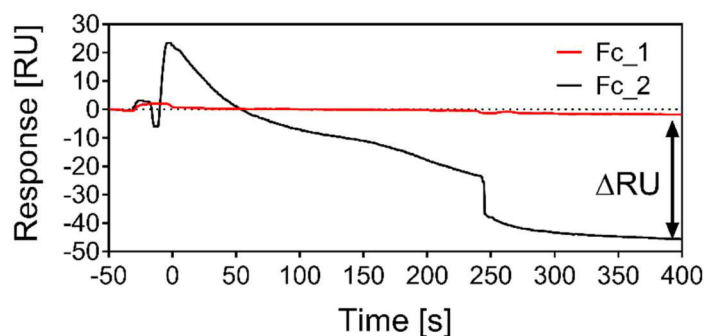


FIG S4: A/Signal decrease (ΔRU) obtained during the enzymatic lysis of reference surface (Fc_2)

SUPPLEMENTARY INFORMATION 3 – Evaluation of influenza virus production kinetics in suspension cell culture and monitoring of influenza virus stability

- **Western Blot Densitometry Analysis**

FIG S5 shows the evaluation of relative total HA content of cell culture supernatants realized by Western Blot densitometry analysis based on universal anti-HA antibodies. The size is concordant with the molecular weight of HA2 subunit (MW~25 kDa).

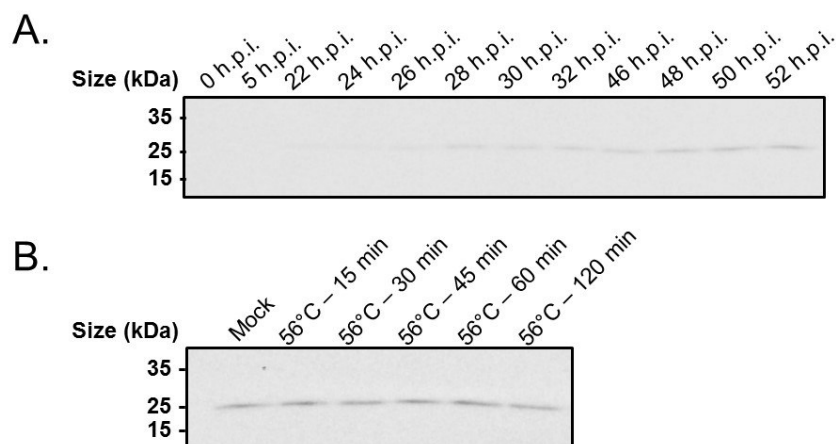


FIG S5 : Western Blot densitometry analysis with universal anti-HA antibodies. A. A/Panama/07/99 (H3N2) production kinetics in T17 suspension cell culture according to time post infection B. Relative HA content of heat-stressed samples (A/Panama/07/99 – 54 h.p.i.) according to sample incubation time at 56°C

- **HA assay**

FIG S6 shows the evaluation of relative HA titers of cell culture supernatants realized by HA assay. HA titers of the cell culture supernatant (A/Panama/07/99 – 54 h.p.i.) were evaluated as 32 and 16 HA units/50 μ L respectively for 0- and 15-min incubation time at 56°C.

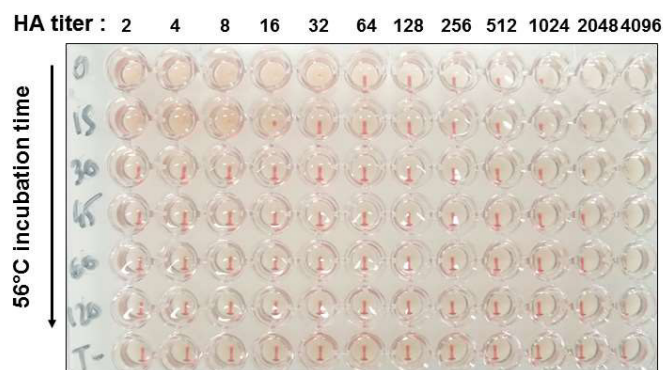


FIG S6 : HA assay of heat-stressed samples (A/Panama/07/99 – 54 h.p.i.) according to sample incubation time at 56°C

SUPPLEMENTARY INFORMATION 4 – Microcontroller Script and Bill of Materials (BOM)

Script for the Arduino microcontroller

```

/*
Cell culture automated sampling system - script for Arduino
by Laurent DUROUS, 2019
Contact : laurent.durous@gmail.com
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.
*/

const int hplc_valve_switch = 9; // HPLC valve connected to pin 9
const int biosep = 10; // Biosep output connected to pin 10
const int bubbledetector = 11; // AD9 bubble detector connected to pin 11
const int valve_1_switch = 12; // Valve 1 circuit connected to pin 12
const int valve_2_switch = 6; // Valve 2 circuit connected to pin 6

// Variables that will change

int valve_1_state = LOW; // Initial value for Valve 1 state
int valve_2_state = LOW; // Initial value for Valve 2 state
int hplc_valve_state = LOW; // Initial value for HPLC valve switch
int last_hplc_valve_state;
int last_AD9_state; // Previous reading from AD9 bubble detector
int val_Biosep; // Variable to store the read value from Biosep
int last_Biosep_state; // Previous reading from Biosep
int AD9_delay = 120; // Delay for Sample Diafiltration (in s)
int syringe_fill_delay = 32; // Delay for Sample Diafiltration (in s)
int TFF_delay = 360; // Delay for Sample Diafiltration (in s)

int val = 0; // variable to store the value read

// the following variables are unsigned longs because the time, measured in milliseconds, will quickly become a bigger number than can be
// stored in an int.

unsigned long interval_AD9 = 1000; // enter the minimum time of liquid detection needed to enable valve switching
unsigned long previousMillis = 0; // millis() returns an unsigned long.
unsigned long interval_calc; // calculate time interval between iterations

void setup() {

  // initialize digital pins as I/Os

  pinMode(LED_BUILTIN, OUTPUT);
  pinMode(valve_1_switch, OUTPUT);
  pinMode(valve_2_switch, OUTPUT);
  pinMode(hplc_valve_switch, OUTPUT);
  pinMode(biosep, INPUT);
  pinMode(bubbledetector, INPUT);

```

```

// set initial state for the valves

digitalWrite(valve_1_switch, valve_1_state);
digitalWrite(valve_2_switch, valve_2_state);
digitalWrite(hplc_valve_switch, hplc_valve_state);
}

void loop() {
  // read the state of the switch into a local variable:

  int val_Biosep = digitalRead(biosep); // read the input pin
  int val_AD9 = digitalRead(bubbledetector); // read the input pin
  unsigned long currentMillis = millis(); // grab current time

  if (val_Biosep != last_Biosep_state) { // Code to switch the HPLC valve to fill the sample loop when the Biosep is in harvest mode
    delay(50);
    digitalWrite(hplc_valve_switch, HIGH);
    digitalWrite(LED_BUILTIN, HIGH);
    delay(50);
  }

  if (val_AD9 == HIGH && last_AD9_state == LOW){
    previousMillis = millis(); // save the "current" time
  }
  interval_calc = (currentMillis - previousMillis);

  if (val_AD9 == LOW && last_AD9_state == HIGH && interval_calc >= interval_AD9){ // only toggle the valves if the new AD9 state is
HIGH for 1 seconds
    delay(1000); // Wait 2s before switching of the sample valve
    digitalWrite(valve_2_switch, HIGH);

    for (int i=0; i <= 3; i++){
      delay(syringefill_delay*1000);
      digitalWrite(valve_1_switch, HIGH);
      digitalWrite(LED_BUILTIN, HIGH);
      delay(syringefill_delay*1000);
      digitalWrite(valve_1_switch, LOW);
      digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW);
    }

    delay(AD9_delay*1000); // Wait the defined delay for buffer withdrawal
    digitalWrite(valve_1_switch, LOW);
    digitalWrite(valve_2_switch, HIGH);
    digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW);
    delay(TFF_delay*1000); // Wait the defined delay for TFF diafiltration
  }

  digitalWrite(valve_1_switch, valve_1_state); // Switch back the valve 1 to its default state
  digitalWrite(valve_2_switch, valve_2_state); // Switch back the valve 2 to its default state
  digitalWrite(hplc_valve_switch, hplc_valve_state);
  last_AD9_state = val_AD9; // Store the last Bubble detector state
  last_Biosep_state = val_Biosep; // Store the last Biosep state
  digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW);
}

```

ANNEXE 4 : PUBLICATIONS ANNEXES

Vaccine 36 (2018) 3101–3111



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Influenza viruses production: Evaluation of a novel avian cell line DuckCelt®-T17

Emma Petiot^{a,*}, Anaïs Proust^a, Aurélien Traversier^a, Laurent Durous^a, Frédéric Dappozze^b, Marianne Gras^c, Chantal Guillard^b, Jean-Marc Balloul^c, Manuel Rosa-Calatrava^{a,*}^a Laboratoire Virologie et Pathologie Humaine – VirPath Team, International Center for Infectious diseases Research, Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Faculté de Médecine RTH Laennec, Lyon, France^b Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5256, IRCELYON, Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon, 2 avenue Albert Einstein, F-69626 Villeurbanne, France^c Transgene, 400 Boulevard Gonthier d'Andernach, Parc d'Innovation, CS80166 67405 Illkirch Graffenstaden Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 29 May 2017Keywords:
Avian cell line
Influenza vaccine
Influenza virus strains
Production process optimization

ABSTRACT

The influenza vaccine manufacturing industry is looking for production cell lines that are easily scalable, highly permissive to multiple viruses, and more effective in term of viral productivity. One critical characteristic of such cell lines is their ability to grow in suspension, in serum free conditions and at high cell densities. Influenza virus causing severe epidemics both in human and animals is an important threat to world healthcare. The repetitive apparition of influenza pandemic outbreaks in the last 20 years explains that manufacturing sector is still looking for more effective production processes to replace/supplement embryonated egg-based process. Cell-based production strategy, with a focus on avian cell lines, is one of the promising solutions. Three avian cell lines, namely duck EB66® cells (Valneva), duck AGE.CR® cells (Probiogen) and quail QOR/2E11 cells (Baxter), are now competing with traditional mammalian cell platforms (Vero and MDCK cells) used for influenza vaccine productions and are currently at advance stage of commercial development for the manufacture of influenza vaccines.

The DuckCelt®-T17 cell line presented in this work is a novel avian cell line developed by Transgene. This cell line was generated from primary embryo duck cells with the constitutive expression of the duck telomerase reverse transcriptase (dTERT). The DuckCelt®-T17 cells were able to grow in batch suspension cultures and serum-free conditions up to 6.5×10^6 cell/ml and were easily scaled from 10 ml up to 3 l bioreactor. In the present study, DuckCelt®-T17 cell line was tested for its abilities to produce various human, avian and porcine influenza strains. Most of the viral strains were produced at significant infectious titers (>5.8 log TCID50/ml) with optimization of the infection conditions. Human strains H1N1 and H3N2, as well as all the avian strains tested (H5N2, H7N1, H3N8, H11N9, H12N5) were the most efficiently produced with highest titre reached of 9.05 log TCID50/ml for A/Panama/2007/99 influenza H3N2. Porcine strains were also greatly rescued with titres from 4 to 7 log TCID50/ml depending of the subtypes. Interestingly, viral kinetics showed maximal titers reached at 24 h post-infection for most of the strains, allowing early harvest time (Time Of Harvest: TOH). The B strains present specific production kinetics with a delay of 24 h before reaching the maximal viral particle release. Process optimization on H1N1 2009 human pandemic strain allowed identifying best operating conditions for production (MOI, trypsin concentration, cell density at infection) allowing improving the production level by 2 log. Our results suggest that the DuckCelt®-T17 cell line is a very promising platform for industrial production of influenza viruses and particularly for avian viral strains.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For the last twenty years, and since the outbreaks of avian H5N1 influenza strain (1997) and the pandemic porcine H1N1 influenza strain (2001), World Health Organisation (WHO) and influenza vaccine manufacturers are looking for new production processes

* Corresponding authors.

E-mail addresses: emma.petiot@univ-lyon1.fr (E. Petiot), manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr (M. Rosa-Calatrava).<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.102>
0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

EXPERT REVIEW OF VACCINES
2019, VOL. 18, NO. 12, 1285–1300
<https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1704262>



REVIEW



Advances in influenza virus-like particles bioprocesses

Laurent Dorous ^a, Manuel Rosa-Calatrava ^{a,b} and Emma Petiot ^a

^aVirologie et Pathologie Humaine - VirPath team - Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France; ^bVirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

ABSTRACT

Introduction: Influenza Virus-like Particles (VLPs) are one of the most promising vaccine strategies to complement traditional egg-based processes and contribute to shortening the 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 the industrial level of development and recent commercialization.

Area covered: This review aims to give an overview of available strategies for influenza-VLP production and their respective stages of development, from small-scale preclinical studies to large-scale industrial processes. Recent trends and fulfillments in purification schemes of influenza VLP were also reviewed with regards to quality and potency requirements that go along with influenza vaccine manufacturing.

Expert opinion: In the next five years, it is expected that there will be licensing of new influenza vaccine products based on VLP strategy. Few VLP upstream processes are mature enough and close to fully complement or seriously concurrence the ovoculture process. Nevertheless, many improvements have yet to be achieved in downstream processes. In the next few years, research efforts in this field are expected to provide purification strategies and tools to achieve higher recovery yields and improve the cost-effectiveness of VLP processes.

ARTICLE HISTORY

Received 11 July 2019
Accepted 9 December 2019

KEYWORDS

Influenza Virus-like Particles;
Recombinant vaccine;
Upstream Process (USP);
Downstream Process (DSP)

1. Introduction

Annual influenza epidemics and the risk of pandemic outbreaks are a worldwide public health concern.

Currently, influenza vaccines are predominantly prepared from virus propagation in embryonated hen's eggs. Such production process suffers from different shortfalls, meaning the process is not satisfactory to face a pandemic crisis. One of its main drawbacks is the duration of the production process, which requires annually up to six months from WHO strain selection to the delivery of millions of vaccine doses [1]. Lessons learned from the recent swine and avian pandemic crises have led to several initiatives in order to ensure optimal and rapid responses to upcoming pandemic outbreaks. One of the most promising alternative vaccination strategies is based on Virus-like particles (VLPs) production. Such strategy is flexible and gives access to a large variety of processes and cell production platforms (see Table 1).

Influenza-VLPs are non-replicating particles mimicking wild-type viruses. They are self-assembled from surface influenza antigens and budding at the cell membrane. Numerous pre-clinical studies have reported a better response with influenza-VLP than the immunogenic

response obtained with soluble recombinant HA or inactivated split vaccine administration (reviewed in [2–5]). Additionally, recent phase II clinical studies demonstrated influenza-VLP vaccination elicits a strong and persistent immunological response in humans [6–9]. Up to now, both insect cells and plant-derived vaccines tested in clinical trials have shown similar reactogenicity to conventional inactivated vaccines [8,9]. However, their manufacturing and process development still necessitate the optimization of numerous variables of upstream and downstream process steps in order to ensure high production yields, product potency, and efficiency in order to ultimately be proposed as a valid alternative to compete with the traditional production processes.

The present review compiles and summarizes the current development stage of influenza cell culture-based VLP production processes. The process and clinical development of influenza-VLP strategies are presented in Table 1.

The review covers more than 15 years of work on the influenza-VLP production strategy, from initial proofs of concept at small scale including first preclinical studies in the early 2000s up to large-scale industrial processes and recent clinical trials.

CONTACT Emma Petiot emma.petiot@cpe.fr ICBMS/ Gembas - 3d.FAB laboratory, Bat. Lederer, 1 rue Victor Grignard, Campus La doua, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France; CPE-Lyon, Bat. curien, 3 rue Victor Grignard, Campus La doua, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France; Manuel Rosa-Calatrava Manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine VirPath - Centre International de Recherche en Infectiologie CIRI U1111 INSERM - UMR 5308 CNRS - ENS Lyon - UCBL1 Faculté de Médecine RTH Laennec 7-11 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon, France

Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

XI.

BIBLIOGRAPHIE

1. OMS. Grippe (saisonnière) [Internet]. 2014. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*. août 2009;143(2):147-61.
3. Centers for Diseases Control and Prevention. Images of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/flu/images.htm>
4. 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*. 11 mai 2010;17(5):530-8.
5. Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza glycoproteins: Hemagglutinin and neuraminidase. *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 67-100.
6. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology*. mai 2002;12(3):159-66.
7. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annual review of pathology*. NIH Public Access; 2008;3:499-522.
8. Yen H-L, Webster RG. Pandemic Influenza as a Current Threat. 2009. p. 3-24.
9. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(3):167-82.
10. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. 2014;14(5):315-28.
11. 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*. Elsevier B.V.; 2014;1838(4):1153-68.
12. 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*. Elsevier B.V.; 2015;94:251-63.
13. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2013;12(9):1085-94.
14. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*. 1 mai 2003;21(16):1776-9.
15. Lambert LC, Fauci AS. Influenza Vaccines for the Future. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(21):2036-44.
16. Cox MMJ, Hollister JR. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*. Elsevier Ltd; 2009;37(3):182-9.
17. 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*. Elsevier Ltd; 2014;32(42):5496-502.
18. Partridge J, Kieny MP. Global production capacity of seasonal influenza vaccine in 2011. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2013;31(5):728-31.
19. Stöhr K. Influenza vaccine production. *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 352-70.
20. 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.
21. Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnology Journal*. mai

- 2015;10(5):728-40.
22. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. Expert review of vaccines. 2009;8(12):1681-92.
 23. Gallo-Ramírez LE, Nikolay A, Genzel Y, Reichl U. Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production. Expert Review of Vaccines. 2 sept 2015;14(9):1181-95.
 24. Lohr V, Hädicke O, Genzel Y, Jordan I, Büntemeyer H, Klamt S, et al. The avian cell line AGE1.CR.pIX characterized by metabolic flux analysis. BMC biotechnology. 2014;14(September 2015):72.
 25. Gränicher G, Coronel J, Pralow A, Marichal-Gallardo P, Wolff M, Rapp E, et al. Efficient influenza A virus production in high cell density using the novel porcine suspension cell line PBG.PK2.1. Vaccine. avr 2019;
 26. Chu C, Lugovtsev V, Lewis A, Betenbaugh M, Shiloach J. Production and antigenic properties of influenza virus from suspension MDCK-siat7e cells in a bench-scale bioreactor. Vaccine. Elsevier Ltd; oct 2010;28(44):7193-201.
 27. 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. 7 mai 2010;28(21):3661-71.
 28. Genzel Y, Vogel T, Buck J, Behrendt I, Ramirez DV, Schiedner G, et al. High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells. Vaccine. 19 mai 2014;32(24):2770-81.
 29. Lohr V, Rath a, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: studies on growth, metabolism and virus propagation. Vaccine. août 2009;27(36):4975-82.
 30. Genzel Y, Behrendt I, Rödiger J, Rapp E, Kueppers C, Kochanek S, et al. CAP, a new human suspension cell line for influenza virus production. Applied Microbiology and Biotechnology. 21 janv 2013;97(1):111-22.
 31. Coussens PM, Smith KA, Weber PSD, Colvin CJ. Immortalized chick embryo cell line adapted to serum-free growth conditions and capable of replicating human and reassortant H5N1 influenza strains for vaccine production. Vaccine. nov 2011;29(47):8661-8.
 32. Petiot E, Proust A, Traversier A, Durois L, Dappozze F, Gras M, et al. Influenza viruses production: Evaluation of a novel avian cell line DuckCelt®-T17. Vaccine. 24 mai 2018;36(22):3101-11.
 33. Rowlen K. Validation of alternative potency assays for influenza vaccines requires clinical studies. Vaccine. Elsevier Ltd; 2015;33(44):6025-6.
 34. 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. janv 2013;10(1):141.
 35. EMA/EDQM. Joint EMA/EDQM workshop on improved potency assays for inactivated influenza vaccines. meeting report 12 Dec 2011. 2012.
 36. WHO Global Influenza Programme. Influenza Vaccine Response during the Start of a Pandemic. Geneva, Switzerland; 2015.
 37. Food and Drugs Administration. Code of Federal Regulations CHAPTER I-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES SUBCHAPTER F-BIOLOGICS PART 600 BIOLOGICAL PRODUCTS: GENERAL. 2018.
 38. European Medicines Agency. ICH Topic Q 6 B - Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. European Medicines Agency. 1999.
 39. Verch T, Trausch JJ, Shank-Retzlaff M. Principles of vaccine potency assays. Bioanalysis. 2018;10(3):163-80.
 40. Zhang B. Issues to Consider When Developing Potency Assays for Biologic Products. CASSS BIOASSAYS : Scientific Approaches & Regulatory Strategies. Washington D.C.; 2014. p. 39.

41. Ward BJ, Pillet S, Charland N, Trepanier S, Landry N, Ward BJ, et al. The establishment of surrogates and correlates of protection : Useful tools for the licensure of effective influenza vaccines ? Taylor & Francis; 2018;5515.
42. Cox R. Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here? Human Vaccines & Immunotherapeutics. 27 févr 2013;9(2):405-8.
43. Nauta JJP, Beyer WEP, Osterhaus ADME. On the relationship between mean antibody level, seroprotection and clinical protection from influenza. Biologicals. Elsevier Ltd; 2009;37(4):216-21.
44. Beyer WEP, Palache AM, Lüchters G, Nauta J, Osterhaus ADME. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: Which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? Virus Research. 2004;103(1-2):125-32.
45. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. The Journal of hygiene. 1972;70(4):767-77.
46. Engelhardt OG, Edge C, Dunleavy U, Guilfoyle K, Harvey R, Major D, et al. Comparison of single radial immunodiffusion, SDS-PAGE and HPLC potency assays for inactivated influenza vaccines shows differences in ability to predict immunogenicity of haemagglutinin antigen. Vaccine. 2018;36(29):4339-45.
47. Ng S, Nachbagauer R, Balmaseda A, Stadlbauer D, Ojeda S, Patel M, et al. Novel correlates of protection against pandemic H1N1 influenza A virus infection. Nature Medicine. Springer US; 2019;
48. Trombetta CM, Montomoli E. Influenza immunology evaluation and correlates of protection: a focus on vaccines. Expert Review of Vaccines. 2016;15(8):967-76.
49. Krammer F. Strategies to induce broadly protective antibody responses to viral glycoproteins. Expert Review of Vaccines. Taylor & Francis; 4 mai 2017;16(5):503-13.
50. Kelly H, Steffens I. Complexities in assessing the effectiveness of inactivated influenza vaccines. Eurosurveillance. 2013;18(7):2011-4.
51. Minor P. Assaying the Potency of Influenza Vaccines. Vaccines. 2015;3(1):90-104.
52. Rieder N, Gazzano-Santoro H, Schenerman M, Strause R, Fuchs C, Mire-Sluis A, et al. The roles of bioactivity assays in lot release and stability testing. BioProcess International. 2010;8(6):33-42.
53. Hirst BYGK. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J Exp Med. 1942;75(1):49-64.
54. Donald HB, Isaacs A. Some Properties of Influenza Virus Filaments shown by Electron Microscopic Particle Counts. Journal of General Microbiology. 1 oct 1954;11(2):325-31.
55. Bousse T, Shore DA, Goldsmith CS, Hossain MJ, Jang Y, Davis CT, et al. Quantitation of influenza virus using field flow fractionation and multi-angle light scattering for quantifying influenza A particles. Journal of Virological Methods. Elsevier B.V.; nov 2013;193(2):589-96.
56. World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization; 2011. 140 p.
57. Kalbfuss B, Knöchlein A, Kröber T, Reichl U. Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. Biologicals. mai 2008;36(3):145-61.
58. Potier, Mameli, Belisle, Dallaire M. Fluorometric Assay of Neuraminidase with a Sodium Substrate. Analytical Biochemistry. 1979;
59. 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.
60. Manceur AP, Kamen A a. Critical review of current and emerging quantification methods for the development of influenza vaccine candidates. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2015;33(44):5913-9.
61. Semenova E, Post P, Fields T, Cox M. Standards and beyond : challenges of application of old methods to next generation products. 2014.
62. Wang W, Suguitan AL, Zengel J, Chen Z, Jin H. Generation of recombinant pandemic H1N1 influenza virus with the HA cleavable by bromelain and identification of the residues influencing HA bromelain cleavage. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2012;30(5):872-8.
63. Elmgren L, Li X, Wilson C, Ball R, Wang J, Cichutek K, et al. A global regulatory science agenda for vaccines. *Vaccine*. avr 2013;31(SUPPL2):B163-75.
64. Hickey JM, Sahni N, Toth RT, Kumru OS, Joshi SB, Middaugh CR, et al. Challenges and opportunities of using liquid chromatography and mass spectrometry methods to develop complex vaccine antigens as pharmaceutical dosage forms. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Elsevier B.V.; 2016;1032:23-38.
65. Khurana S, King LR, Manischewitz J, Coyle EM, Golding H. Novel antibody-independent receptor-binding SPR-based assay for rapid measurement of influenza vaccine potency. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2014;32(19):2188-97.
66. Ennis FA, Mayner RE, Barry DW, Manischewitz JE, Dunlap RC, Verbonitz MW, et al. Correlation of Laboratory Studies with Clinical Responses to A/New Jersey Influenza Vaccines. *Journal of Infectious Diseases*. 1 déc 1977;136(Supplement 3):S397-406.
67. Getie-Kehtie M, Lazarev A, Eichelberger M, Alterman M. Label-free mass spectrometry-based relative quantification of proteins separated by one-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc.; févr 2011;409(2):202-12.
68. Wen Y, Palladino G, Xie Y, Ferrari A, Ma X, Han L, et al. Trypsin pre-treatment corrects SRID over-estimation of immunologically active, pre-fusion HA caused by mixed immunoprecipitin rings. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2016;34(29):3388-95.
69. Harvey R, Hamill M, Robertson JS, Minor PD, Vodeiko GM, Weir JP, et al. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals*. Elsevier Ltd; janv 2012;40(1):96-9.
70. Kuck LR, Saye S, Loob S, Roth-Eichhorn S, Byrne-Nash R, Rowlen KL. VaxArray assessment of influenza split vaccine potency and stability. *Vaccine*. The Author(s); avr 2017;35(15):1918-25.
71. European Medicines Agency. Guideline on Influenza vaccines - Quality module. 2017.
72. Hardy S, Eichelberger M, Griffiths E, Weir JP, Wood D, Alfonso C. Confronting the next pandemic-Workshop on lessons learned from potency testing of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccines and considerations for future potency tests, Ottawa, Canada, July 27-29, 2010. *Influenza and other Respiratory Viruses*. 2011;5(6):438-42.
73. Calam DH, Davidson J. Isolation of influenza viral proteins by size-exclusion and ion-exchange high-performance liquid chromatography: the influence of conditions on separation. *Journal of Chromatography A*. juill 1984;296:285-92.
74. Phelan MA, Cohen KA. Gradient optimization principles in reversed-phase high-performance liquid chromatography and the separation of influenza virus components. *Journal of Chromatography A*. août 1983;266:55-66.
75. Li C, Shao M, Cui X, Song Y, Li J, Yuan L, et al. Application of deglycosylation and electrophoresis to the quantification of influenza viral hemagglutinins facilitating the production of 2009 pandemic influenza (H1N1) vaccines at multiple manufacturing sites in China. *Biologicals : journal of the International Association of*

- Biological Standardization. Elsevier Ltd; mars 2010;38(2):284-9.
76. Wood JM, Weir JP. Standardisation of inactivated influenza vaccines - learning from history. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2018;(January):1-7.
77. Garcia-Cañas V, Lorbetskie B, Girard M. Rapid and selective characterization of influenza virus constituents in monovalent and multivalent preparations using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*. 11 août 2006;1123(2):225-32.
78. Kapteyn JC, Porre AM, de Rond EJP, Hessels WB, Tijms MA, Kessen H, et al. HPLC-based quantification of haemagglutinin in the production of egg- and MDCK cell-derived influenza virus seasonal and pandemic vaccines. *Vaccine*. 25 févr 2009;27(9):1468-77.
79. Lorbetskie B, Wang J, Gravel C, Allen C, Walsh M, Rinfret A, et al. Optimization and qualification of a quantitative reversed-phase HPLC method for hemagglutinin in influenza preparations and its comparative evaluation with biochemical assays. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2011;29(18):3377-89.
80. Lorbetskie B, Fortin N, Durno L, Wang J, Li C, Li X, et al. Fast and highly selective determination of hemagglutinin content in quadrivalent influenza vaccine by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V.; 2017;1528:18-24.
81. Wen Y, Han L, Palladino G, Ferrari A, Xie Y, Carfi A, et al. Conformationally selective biophysical assay for influenza vaccine potency determination. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2015;33(41):5342-9.
82. García-Cañas V, Lorbetskie B, Bertrand D, Cyr TD, Girard M. Selective and Quantitative Detection of Influenza Virus Proteins in Commercial Vaccines Using Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*. avr 2007;79(8):3164-72.
83. Lorbetskie B, Wang J, Gravel C, Allen C, Walsh M, Rinfret A, et al. Optimization and qualification of a quantitative reversed-phase HPLC method for hemagglutinin in influenza preparations and its comparative evaluation with biochemical assays. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 18 avr 2011;29(18):3377-89.
84. Williams TL, Luna L, Guo Z, Cox NJ, Pirkle JL, Donis RO, et al. Quantification of influenza virus hemagglutinins in complex mixtures using isotope dilution tandem mass spectrometry. *Vaccine*. 12 mai 2008;26(20):2510-20.
85. Morgenstern K, Xie Y, Palladino G, Barr JR, Settembre EC, Williams TL, et al. Reference antigen-free and antibody-free LTD-IDMS assay for influenza H7N9 vaccine in vitro potency determination. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2018;36(41):6144-51.
86. Pierce CL, Williams TL, Santana WI, Levine M, Chen LM, Cooper HC, et al. Immunocapture isotope dilution mass spectrometry in response to a pandemic influenza threat. *Vaccine*. 2017;35(37):5011-8.
87. Pierce CL, Williams TL, Moura H, Pirkle JL, Cox NJ, Stevens J, et al. Quantification of immunoreactive viral influenza proteins by immunoaffinity capture and isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2011;83(12):4729-37.
88. Getie-Kehtie M, Sultana I, Eichelberger M, Alterman M. Label-free mass spectrometry-based quantification of hemagglutinin and neuraminidase in influenza virus preparations and vaccines. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. juill 2013;7(4):521-30.
89. Creskey MC, Li C, Wang J, Girard M, Lorbetskie B, Gravel C, et al. Simultaneous quantification of the viral antigens hemagglutinin and neuraminidase in influenza vaccines by LC-MSE. *Vaccine*. Elsevier Ltd; juill 2012;30(32):4762-70.
90. Solano MI, Woolfitt AR, Williams TL, Pierce CL, Gubareva L V., Mishin V, et al. Quantification of Influenza Neuraminidase Activity by Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 7 mars 2017;89(5):3130-7.
91. Bodle J, Verity EE, Ong C, Vandenberg K, Shaw R, Barr IG, et al. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantitation of influenza haemagglutinin: An alternative method to single radial

- immunodiffusion. *Influenza and other Respiratory Viruses*. 2013;7(2):191-200.
92. Legastelois I, Chevalier M, Bernard M-C, de Montfort A, Fouque M, Pilloud A, et al. Avian glycan-specific IgM monoclonal antibodies for the detection and quantitation of type A and B haemagglutinins in egg-derived influenza vaccines. *Journal of Virological Methods*. Elsevier B.V.; déc 2011;178(1-2):129-36.
 93. Hashem AM, Gravel C, Farnsworth A, Zou W, Lemieux M, Xu K, et al. A novel synthetic receptor-based immunoassay for influenza vaccine quantification. *PloS one*. janv 2013;8(2):e55428.
 94. Chun S, Li C, Van Domselaar G, Wang J, Farnsworth A, Cui X, et al. Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins. *Vaccine*. 11 nov 2008;26(48):6068-76.
 95. Li C, Jaentschke B, Song Y, Wang J, Cyr TD, Van Domselaar G, et al. A simple slot blot for the detection of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins using universal antibodies targeting the fusion peptide. *Nature protocols*. Nature Publishing Group; janv 2010;5(1):14-9.
 96. Manceur AP, Zou W, Marcil A, Paquet E, Gadoury C, Jaentschke B, et al. Generation of monoclonal pan-hemagglutinin antibodies for the quantification of multiple strains of influenza. *PLoS ONE*. 2017;12(6):1-18.
 97. Buffin S, Ikhelef N, Prudent J, Dubayle J, Nougarede N, Varenne MP, et al. A latex agglutination assay to quantify the amount of hemagglutinin protein in adjuvanted low-dose influenza monovalent vaccines. *Journal of Virological Methods*. 2018;251(October 2017):46-53.
 98. IndevR. The VaxArray® Platform [Internet]. 2019 [cité 12 juill 2019]. Disponible sur: <https://indevr.com/products/vaxarray/>
 99. Byrne-Nash RT, Gillis JH, Miller DF, Bueter KM, Kuck LR, Rowlen KL. A neuraminidase potency assay for quantitative assessment of neuraminidase in influenza vaccines. *npj Vaccines*. Springer US; 22 déc 2019;4(1):3.
 100. Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA. Influenza HA Subtypes Demonstrate Divergent Phenotypes for Cleavage Activation and pH of Fusion: Implications for Host Range and Adaptation. Kawaoka Y, éditeur. *PLoS Pathogens*. 14 févr 2013;9(2):e1003151.
 101. Kuck LR, Byrne-Nash R, Gillis J, Bueter K, Couzens LK, Eichelberger MC, et al. VaxArray for hemagglutinin and neuraminidase potency testing of influenza vaccines. *Vaccine*. The Author(s); mai 2018;36(21):2937-45.
 102. Nilsson CE, Abbas S, Bennemo M, Larsson a, Hämäläinen MD, Frostell-Karlsson a. A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance. *Vaccine*. 8 janv 2010;28(3):759-66.
 103. Teixeira AP, Oliveira R, Alves PM, Carrondo MJT. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnology Advances*. Elsevier B.V.; nov 2009;27(6):726-32.
 104. Rathore AS, Bhambure R, Ghare V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(1):137-54.
 105. FDA. Guidance for Industry Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical, Development, Manufacturing, and Quality Assurance. Quality Assurance. FDA; 2004.
 106. Mandenius C-F, Graumann K, Schultz TW, Premstaller A, Olsson I-M, Petiot E, et al. Quality-by-design for biotechnology-related pharmaceuticals. *Biotechnology journal*. mai 2009;4(5):600-9.
 107. Whitford W, Julien C. Analytical Technology and PAT. *Bioprocess International*. 2007;5:S32-41.
 108. Petiot E, Jacob D, Lanthier S, Lohr V, Ansorge S, Kamen AA. Metabolic and kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. *BMC biotechnology*. janv 2011;11:84.
 109. Petiot E, Ansorge S, Rosa-Calatrava M, Kamen A. Critical phases of viral production processes monitored by capacitance. *Journal of Biotechnology*. 2017;242.
 110. Emma P, Kamen A. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures.

- Biotechnology Progress. janv 2013;29(1):275-84.
111. Frensing T, Heldt FS, Pflugmacher A, Behrendt I, Jordan I, Flockerzi D, et al. Continuous Influenza Virus Production in Cell Culture Shows a Periodic Accumulation of Defective Interfering Particles. Pöhlmann S, éditeur. PLoS ONE. 5 sept 2013;8(9):e72288.
 112. Frensing T. Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors. Biotechnology Journal. 2015;10(5):681-9.
 113. Pais DAM, Portela RMC, Carrondo MJT, Isidro IA, Alves PM. Enabling Pat in insect cell bioprocesses: in-situ monitoring of recombinant adeno-associated virus production by fluorescence spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering. 17 juill 2019;bit.27117.
 114. Heider S, Metzner C. Quantitative real-time single particle analysis of virions. Virology. Elsevier; 2014;462-463(1):199-206.
 115. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Epidemiology. mai 1938;27(3):493-7.
 116. Dulbecco R. PLAQUE FORMATION AND ISOLATION OF PURE LINES WITH POLIOMYELITIS VIRUSES. Journal of Experimental Medicine. 31 janv 1954;99(2):167-82.
 117. Masci AL, Menesale EB, Chen W-C, Co C, Lu X, Bergelson S. Integration of Fluorescence Detection and Image-Based Automated Counting Increases Speed, Sensitivity, and Robustness of Plaque Assays. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. sept 2019;14:270-4.
 118. Roldão A, Oliveira R, Carrondo MJT, Alves PM. Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. Journal of Virological Methods. 2009;159(1):69-80.
 119. Stepp PC, Ranno KA, Dawson ED, Rowlen KL, Ferris MM. Comparing H1N1 Virus quantification with unique flow cytometer and quantitative PCR. BioProcess International. 2011;9(8):50-6.
 120. Rossi CA, Kearney BJ, Olschner SP, Williams PL, Robinson CG, Heinrich ML, et al. Evaluation of ViroCyt@Virus counter for rapid filovirus quantitation. Viruses. 2015;7(3):857-72.
 121. Vogel R, Willmott G, Kozak D, Roberts GS, Anderson W, Groenewegen L, et al. Quantitative sizing of nano/microparticles with a tunable elastomeric pore sensor. Analytical Chemistry. 2011;83(9):3499-506.
 122. Vogel R, Coumans FAW, Maltesen RG, Böing AN, Bonnington KE, Broekman ML, et al. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. Journal of Extracellular Vesicles. 2016;5(1).
 123. Kramberger P, Ciringer M, Štrancar A, Peterka M. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for total virus particle determination. Virology Journal. 12 déc 2012;9(1):265.
 124. Wei Z, Mcevoy M, Razinkov V, Polozova A, Li E, Casas-Finet J, et al. Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: Correlation of particle counts, size distribution and infectivity. Journal of Virological Methods. sept 2007;144(1-2):122-32.
 125. Parupudi A, Gruia F, Korman SA, Dragulin-Otto S, Sra K, Remmele RL, et al. Biophysical characterization of influenza A virions. Journal of Virological Methods. 2017;247(March):91-8.
 126. Donald HB, Isaacs A. Counts of Influenza Virus Particles. Journal of General Microbiology. 1 juin 1954;10(3):457-64.
 127. Soler M. Nanoplasmonic Biosensors for Clinical Diagnosis at the Point of Care. Universitat Autònoma de Barcelona; 2015.
 128. Turner APF. Current trends in biosensor research and development. Sensors and Actuators. mai 1989;17(3-4):433-50.
 129. Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. Annals of the

- New York Academy of Sciences. 1962;102(1):29-45.
130. Newman JD, Setford SJ. Enzymatic Biosensors. *Molecular Biotechnology*. 2006;32(3):249-68.
131. Liedberg B, Nylander C, Lunström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. 10 janv 1983;4:299-304.
132. Sjölander S, Urbaniczky C. Integrated Fluid Handling System for Biomolecular Interaction Analysis. *Analytical Chemistry*. 1991;63(20):2338-45.
133. Schasfoort RBM. Chapter 2. History and Physics of Surface Plasmon Resonance. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; p. 27-59.
134. Homola J. Electromagnetic Theory of Surface Plasmons. In: Homola J, éditeur. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 3-44.
135. Homola J, Piliarik M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors. In: Homola J, éditeur. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 45-67.
136. Laplatine L. Spatial resolution of prism-based surface plasmon resonance microscopy. Université de Grenoble; 2014.
137. Okamoto T, Yamaguchi I. Surface plasmon microscope. In: Lanzl F, Preuss H-J, Weigelt G, éditeurs. *Optics in Complex Systems*. 1990. p. 472.
138. Maillart E. IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL. Université Paris Sud - Paris XI; 2008.
139. Zhao H, Brown PH, Schuck P. On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. *Biophysical Journal*. mai 2011;100(9):2309-17.
140. Rupert DLM, Lässer C, Eldh M, Block S, Zhdanov VP, Lotvall JO, et al. Determination of exosome concentration in solution using surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2014;86(12):5929-36.
141. Jung LS, Campbell CT, Chinowsky TM, Mar MN, Yee SS. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir*. 1998;14(19):5636-48.
142. Stevens J, Blixt O, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2 nov 2006;4(11):857-64.
143. Desmet C, Marquette CA. Surface Functionalization for Immobilization of Probes on Microarrays. 2016. p. 7-23.
144. Corgier BP, Mandon CA, Le Goff GC, Blum LJ, Marquette CA. Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools. *Lab on a Chip*. 2011;11(17):3006.
145. Corgier BP, Bellon S, Anger-Leroy M, Blum LJ, Marquette CA. Protein–Diazonium Adduct Direct Electrografting onto SPRi-Biochip. *Langmuir*. 18 août 2009;25(16):9619-23.
146. Natarajan S, Katsamba PS, Miles A, Eckman J, Papalia GA, Rich RL, et al. Continuous-flow microfluidic printing of proteins for array-based applications including surface plasmon resonance imaging. *Analytical Biochemistry*. févr 2008;373(1):141-6.
147. GE Healthcare. *Biacore Sensor Surface Handbook*. 2005.
148. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*. avr 2005;105(4):1103-70.
149. Gedig ET. Chapter 6. Surface Chemistry in SPR Technology. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; p. 173-220.

150. Livache T, Roget A, Dejean E, Barthet C, Bidan G, Teoule R. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*. 1994;22(15):2915-21.
151. Mandon CA, Blum LJ, Marquette CA. Aryl Diazonium for Biomolecules Immobilization onto SPRI Chips. *ChemPhysChem*. WILEY-VCH Verlag; 2009;10(18):3273-7.
152. Chao H, Houston ME, Grothe S, Kay CM, O'Connor-McCourt M, Irvin RT, et al. Kinetic Study on the Formation of a de Novo Designed Heterodimeric Coiled-Coil: Use of Surface Plasmon Resonance To Monitor the Association and Dissociation of Polypeptide Chains †. *Biochemistry*. janv 1996;35(37):12175-85.
153. Chadli M, Rebaud S, Maniti O, Tillier B, Cortès S, Girard-Egrot A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir*. 3 oct 2017;33(39):10385-401.
154. Berthuy OI, Blum LJ, Marquette CA. Cancer-Cells on Chip for Label-Free Detection of Secreted Molecules. *Biosensors*. 2016;6(1):2.
155. Hong X, Hall EAH. Contribution of gold nanoparticles to the signal amplification in surface plasmon resonance. *The Analyst*. 2012;137(20):4712.
156. Špringer T, Ermini ML, Špačková B, Jabloňků J, Homola J. Enhancing Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Biosensors by Functionalized Gold Nanoparticles: Size Matters. *Analytical Chemistry*. 21 oct 2014;86(20):10350-6.
157. Durous L, Julien T, Padey B, Traversier A, Rosa-Calatrava M, Blum LJ, et al. SPRI-based hemagglutinin quantitative assay for influenza vaccine production monitoring. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 14 mars 2019;37(12):1614-21.
158. 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*. 2014;5(May):4816.
159. Cohen M. Notable Aspects of Glycan-Protein Interactions. *Biomolecules*. 2015;5(3):2056-72.
160. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 29 sept 2014;12(11):739-49.
161. Thompson AJ, de Vries RP, Paulson JC. Virus recognition of glycan receptors. *Current Opinion in Virology*. févr 2019;34:117-29.
162. Mammen M, Choi S-K, Whitesides GM. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Ed*. 1998;37(20):2754-94.
163. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 1983;127(2):361-73.
164. Gambaryan AS, Matrosovich MN. A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *Journal of Virological Methods*. 1992;39(1-2):111-23.
165. Mammen M, Dahmann G, Whitesides GM. Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*. oct 1995;38(21):4179-90.
166. Blixt O, Head S, Mondala T, Scanlan C, Huflejt ME, Alvarez R, et al. Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17033-8.
167. McBride R, Paulson JC, de Vries RP. A Miniaturized Glycan Microarray Assay for Assessing Avidity and Specificity of Influenza A Virus Hemagglutinins. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;(111):25-9.
168. Guo H, Rabouw H, Slomp A, Dai M, van der Vegt F, van Lent JWM, et al. Kinetic analysis of the influenza

- A virus HA/NA balance reveals contribution of NA to virus-receptor binding and NA-dependent rolling on receptor-containing surfaces. *PLoS Pathogens*. 2018. 1-31 p.
169. Di Iorio D, Verheijden ML, Van Der Vries E, Jonkheijm P, Huskens J. Weak Multivalent Binding of Influenza Hemagglutinin Nanoparticles at a Sialoglycan-Functionalized Supported Lipid Bilayer. *ACS Nano*. American Chemical Society; 2019;13(3):3413-23.
 170. Smith DF, Cummings RD. Investigating virus-glycan interactions using glycan microarrays. *Current Opinion in Virology*. 2014;7(1):79-87.
 171. Ji Y, White YJ, Hadden JA, Grant OC, Woods RJ. New insights into influenza A specificity: an evolution of paradigms. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017;44:219-31.
 172. Benton DJ, Martin SR, Wharton SA, McCauley JW. Biophysical measurement of the balance of influenza A hemagglutinin and neuraminidase activities. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(10):6516-21.
 173. Ji Y, Woods RJ. Quantifying Weak Glycan-Protein Interactions Using a Biolayer Interferometry Competition Assay: Applications to ECL Lectin and X-31 Influenza Hemagglutinin. In: Yamaguchi Y, Kato K, éditeurs. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 259-73.
 174. Sauter NK, Hanson JE, Glick GD, Brown JH, Crowther RL, Park SJ, et al. Binding of Influenza Virus Hemagglutinin to Analogs of Its Cell-Surface Receptor, Sialic Acid: Analysis by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and X-ray Crystallography. *Biochemistry*. 1992;31(40):9609-21.
 175. Xiong X, Coombs PJ, Martin SR, Liu J, Xiao H, McCauley JW, et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature*. 24 mai 2013;497(7449):392-6.
 176. Peng W, de Vries RP, Grant OC, Thompson AJ, McBride R, Tsogtbaatar B, et al. Recent H3N2 Viruses Have Evolved Specificity for Extended, Branched Human-type Receptors, Conferring Potential for Increased Avidity. *Cell Host & Microbe*. Elsevier Inc.; 2016;21(1):23-34.
 177. Liao H-Y, Hsu C-H, Wang S-C, Liang C-H, Yen H-Y, Su C-Y, et al. Differential Receptor Binding Affinities of Influenza Hemagglutinins on Glycan Arrays. *Journal of the American Chemical Society*. 27 oct 2010;132(42):14849-56.
 178. Kuck LR, Sorensen M, Matthews E, Srivastava I, Cox MMJ, Rowlen KL. Titer on chip: New analytical tool for influenza vaccine potency determination. *PLoS ONE*. 2014;9(10):1-10.
 179. Byrne-Nash RT, Miller DF, Bueter KM, Gillis JH, Kuck LR, Rowlen KL. VaxArray potency assay for rapid assessment of “pandemic” influenza vaccines. *npj Vaccines*. Springer US; 8 déc 2018;3(1):43.
 180. McCraw DM, Gallagher JR, Harris AK. Characterization of influenza vaccine hemagglutinin complexes by cryo-electron microscopy and image analyses reveals structural polymorphisms. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016;23(6):483-95.
 181. Gallagher JR, McCraw DM, Torian U, Gulati NM, Myers ML, Conlon MT, et al. Characterization of hemagglutinin antigens on influenza virus and within vaccines using electron microscopy. *Vaccines*. 2018;6(2).
 182. Wang S, Shan X, Patel U, Huang X, Lu J, Li J, et al. Label-free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(37):16028-32.
 183. Daaboul GG, Yurt A, Zhang X, Hwang GM, Goldberg BB, Ünlü MS. High-throughput detection and sizing of individual low-index nanoparticles and viruses for pathogen identification. *Nano Letters*. 2010;10(11):4727-31.
 184. Avci O, Ünlü NL, Özkumur AY, Ünlü MS. Interferometric reflectance imaging sensor (IRIS)—a platform technology for multiplexed diagnostics and digital detection. *Sensors (Switzerland)*. 2015;15(7):17649-65.
 185. Shpacovitch V, Sidorenko I, Lenssen JE, Temchura V, Weichert F, Müller H, et al. Application of the PAMONO-sensor for quantification of microvesicles and determination of nano-particle size distribution.

- Sensors (Switzerland). 2017;17(2).
186. Kuzmichev A, Skolnik J, Zybin A, Hergenröder R. Absolute Analysis of Nanoparticle Suspension with Surface Plasmon Microscopy. *Analytical Chemistry*. 18 sept 2018;90(18):10732-7.
187. Sakai T, Nishimura SI, Naito T, Saito M. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group; 2017;7(March):45043.
188. Müller M, Lauster D, Wildenauer HHK, Herrmann A, Block S. Mobility-Based Quantification of Multivalent Virus-Receptor Interactions: New Insights into Influenza A Virus Binding Mode. *Nano Letters*. 2019;19(3):1875-82.
189. Lee DW, Hsu HL, Bacon KB, Daniel S. Image restoration and analysis of influenza virions binding to membrane receptors reveal adhesion-strengthening kinetics. *PLoS ONE*. 2016;11(10).
190. Arima A, Harlisa IH, Yoshida T, Tsutsui M, Tanaka M, Yokota K, et al. Identifying Single Viruses Using Biorecognition Solid-State Nanopores. *Journal of the American Chemical Society*. 5 déc 2018;140(48):16834-41.
191. Von Borries B, Ruska E, Ruska H. Bakterien und Virus in Übermikroskopischer Aufnahme. *Klinische Wochenschrift*. juill 1938;17(27):921-5.
192. Stoffel CL, Kathy RF, Rowlen KL. Design and characterization of a compact dual channel virus counter. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. juin 2005;65(2):140-7.
193. Harris AK, Meyerson JR, Matsuoka Y, Kuybeda O, Moran A, Bliss D, et al. Structure and accessibility of HA trimers on intact 2009 H1N1 pandemic influenza virus to stem region-specific neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19 mars 2013;110(12):4592-7.
194. Myska DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal*. 1998;75(2):583-94.
195. Karlsson R. Biosensor binding data and its applicability to the determination of active concentration. *Biophysical Reviews*. *Biophysical Reviews*; 2016;8(4):347-58.
196. Myska DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997;8(1):50-7.
197. Pol E, Roos H, Markey F, Elwinger F, Shaw A, Karlsson R. Evaluation of calibration-free concentration analysis provided by Biacore™ systems. *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc; oct 2016;510:88-97.
198. Christensen L. Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Analytical biochemistry*. 1997;249(2):153-64.
199. Karlsson R, Roos H. METHOD OF DETERMINING ACTIVE CONCENTRATION BY CALIBRATION-FREE ANALYSIS. WIPO/PCT; WO 2013/002717, 2013.
200. Jacquemart R, Chavane N, Durocher Y, Hoemann C, De Crescenzo G, Jolicoeur M. At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnology and Bioengineering*. 1 mai 2008;100(1):184-8.
201. Chavane N, Jacquemart R, Hoemann CD, Jolicoeur M, De Crescenzo G. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical Biochemistry*. 2008;378(2):158-65.
202. Dorion-thibaudeau J, Durocher Y, Crescenzo G De. Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture — The use of the ectodomain of Fc RI and surface plasmon resonance-based biosensor. *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd; 2017;82:46-9.
203. Westdijk J, Brugmans D, Martin J, Oever A van't, Bakker WAM, Levels L, et al. Characterization and

- standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: Proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine*. avr 2011;29(18):3390-7.
204. Consortium for functional Glycomics. Reagent Bank [Internet]. 2011 [cité 15 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecored1.shtml>
205. ATCC. Product sheet - MDCK (NBL-2) (ATCC ® CCL- 34TM) [Internet]. [cité 7 sept 2019]. p. 1-3. Disponible sur: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-34.aspx?geo_country=fr
206. Hutchinson EC, Stegmann M. Purification and Proteomics of Influenza Virions. 2018. p. 89-120.
207. Tudos AJ, Schasfoort RBM. Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; p. 1-14.
208. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 7 mai 1976;72(1-2):248-54.
209. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. oct 1985;150(1):76-85.
210. Trampler F, Sonderhoff SA, Pui PWS, Kilburn DG, Piret JM. Acoustic Cell Filter for High Density Perfusion Culture of Hybridoma Cells. *Nature Biotechnology*. mars 1994;12(3):281-4.
211. Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. Insights Into Adenoviral Vector Production Kinetics in Acoustic Filter-Based Perfusion Cultures. *Biotechnology and bioengineering*. 2004;86(7):765-74.
212. Applikon Biotechnology. Biosep 10L Manual - Acoustic Cell Separator with Controller APS 990. 2018.
213. Introtek. AD8 / AD9 SERIES SENSOR [Internet]. 2016 [cité 10 juill 2019]. Disponible sur: <https://introtek.com/productslist/air-bubble-detector/ad8-ad9-adu/>
214. GE Healthcare. Peristaltic Pump P-1. 2005.
215. SIGMA. Fetuin from fetal calf serum - F3004 Product information Sheet.
216. UniProtKB. P12763 (FETUA_BOVIN) [Internet]. 2019 [cité 8 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprot/P12763>
217. Takemoto DK, Skehel JJ, Wiley DC. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology*. 1996;217(2):452-8.
218. Jiang L, Eichelberger MC. Evaluation of Epic® label-free technology to quantify functional recombinant hemagglutinin. *Biological Procedures Online*. 2015;17(1):7.
219. Slifka MK, Amanna IJ. Role of multivalency and antigenic threshold in generating protective antibody responses. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(MAY):1-16.
220. Cai H, Zhang R, Orwenyo J, Giddens J, Yang Q, Labranche CC, et al. Multivalent Antigen Presentation Enhances the Immunogenicity of a Synthetic Three-Component HIV-1 V3 Glycopeptide Vaccine. *ACS Central Science*. 2018;4(5):582-9.
221. Rupert DLM, Claudio V, Lässer C, Bally M. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Elsevier B.V.; janv 2017;1861(1):3164-79.
222. Coumans FAW, van der Pol E, Belling AN, Hajji N, Sturk G, van Leeuwen TG, et al. Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3(1).
223. Robert J. Les tétraspanines, molécules d'adhésion encore bien mal connues. *VEGF*. 2014;10-2.
224. 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*. janv 2015;15(1):31.
225. 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*. 2008;338(1-2):21-30.
226. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, Berger E, Aguilar PP, Schneider TA, et al. Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles. *Journal of Chromatography A*. 2016;1455:93-101.
227. Venereo-Sánchez A, Fulton K, Koczka K, Twine S, Chahal P, Ansorge S, et al. Characterization of influenza H1N1 Gag virus-like particles and extracellular vesicles co-produced in HEK-293SF. *Vaccine*. nov 2019;37(47):7100-7.
228. Grasso L, Wyss R, Weidenauer L, Thampi A, Demurtas D, Prudent M, et al. Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(18):5425-32.
229. Rupert DLM, Lässer C, Eldh M, Block S, Zhdanov VP, Lotvall JO, et al. Determination of Exosome Concentration in Solution Using Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2014;86(12):5929-36.
230. Gool EL, Stojanovic I, Schasfoort RBM, Sturk A, Van Leeuwen TG, Nieuwland R, et al. Surface plasmon resonance is an analytically sensitive method for antigen profiling of extracellular vesicles. *Clinical Chemistry*. 2017;63(10):1633-41.
231. Vachieri SG, Xiong X, Collins PJ, Walker PA, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by H10 influenza viruses. *Nature*. 23 juill 2014;511(7510):475-7.
232. Daniel C, Roupiez Y, Gasparutto D, Livache T, Buhot A. Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *Wanunu M, éditeur. PLoS ONE*. 17 sept 2013;8(9):e75419.
233. Karlsson R, Fägerstam L, Nilshans H, Persson B. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *Journal of Immunological Methods*. nov 1993;166(1):75-84.
234. Karlsson R, Fridh V, Frostell Å. Surrogate potency assays: Comparison of binding profiles complements dose response curves for unambiguous assessment of relative potencies. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018;8(2):138-46.
235. Florin L, Lang T. Tetraspanin assemblies in virus infection. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(MAY):1-9.
236. Lohr V, Genzel Y, Behrendt I, Scharfenberg K, Reichl U. A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor. *Vaccine*. Elsevier Ltd; août 2010;28(38):6256-64.
237. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V.; 2012;1820(7):940-8.
238. Picciolini S, Gualerzi A, Vanna R, Sguassero A, Gramatica F, Bedoni M, et al. Detection and Characterization of Different Brain-Derived Subpopulations of Plasma Exosomes by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry*. 7 août 2018;90(15):8873-80.
239. Gori A, Romanato A, Bergamaschi G, Strada A, Gagni P, Frigerio R, et al. Membrane-Binding Peptides for Extracellular Vesicles On-Chip Analysis. 2019;
240. Milián E, Kamen A a. Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines. 2015;2015.
241. Lohr V, Genzel Y, Jordan I, Katinger D, Mahr S, Sandig V, et al. Live attenuated influenza viruses produced in a suspension process with avian AGE1.CR.pIX cells. *BMC biotechnology*. *BMC Biotechnology*; janv 2012;12(1):79.

242. Ansorge S, Esteban G, Schmid G. On-line monitoring of responses to nutrient feed additions by multi-frequency permittivity measurements in fed-batch cultivations of CHO cells. *Cytotechnology*. avr 2010;62(2):121-32.
243. Ansorge S, Henry O, Aucoin M, Voyer R, Carvell JP, Kamen AA. on-line monitoring of cell size distribution in mammalian cell culture processes. In: Noll T, éditeur. *Cells and Culture: Proceedings of the 20th ESACT Meeting*, Dresden, Germany,. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 853-9.
244. Petiot E, El-Wajgali A, Esteban G, Géný C, Pinton H, Marc A. In-situ cell density monitoring and apoptosis detection in adherent Vero cell bioreactor cultures. *BMC proceedings*. janv 2011;5 Suppl 8:P8.
245. Carvell JP, Dowd JE. On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance. *Cytotechnology*. mars 2006;50(1-3):35-48.
246. Whelan J, Craven S, Glennon B. In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors. *Biotechnology Progress*. 2012;28(5):1355-62.
247. Petiot E, Bernard-Moulin P, Magadoux T, Géný C, Pinton H, Marc A. In situ quantification of microcarrier animal cell cultures using near-infrared spectroscopy. *Process Biochemistry*. août 2010;45(8):1427-31.
248. Ansorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, Henry O, Kamen A. Monitoring lentiviral vector production kinetics using online permittivity measurements. *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V.; mars 2011;54(1):16-25.
249. Petiot E, Kamen AA, Emma P. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures. *Biotechnology progress*. juill 2012;
250. Nilsson CE, Abbas S, Bennemo M, Larsson A, Hämäläinen M. Improving influenza vaccine quantification ; a comparative study of SRID and SPR. 2008;5(3):2010.
251. Eisfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nature Protocols*. 16 nov 2014;9(11):2663-81.
252. Moulès V, Terrier O, Yver M, Riteau B, Moriscot C, Ferraris O, et al. Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology*. Elsevier Inc.; 2011;414(1):51-62.
253. Wen Y, Han L, Palladino G, Ferrari A, Xie Y, Carfi A, et al. Conformationally selective biophysical assay for influenza vaccine potency determination. *Vaccine*. Elsevier Ltd; oct 2015;33(41):5342-9.
254. Petiot E, Cuperlovic-Culf M, Shen CF, Kamen A. Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine*. nov 2015;33(44):5974-81.
255. Transfiguracion J, Manceur AP, Petiot E, Thompson CM, Kamen A a. Particle quantification of influenza viruses by high performance liquid chromatography. *Vaccine*. 1 janv 2015;33(1):78-84.
256. 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*. 2014;14(3):318-26.
257. 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*. 1 mai 2007;97(1):73-85.
258. Wolff MW, Reichl U. Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Review of Vaccines*. 9 oct 2011;10(10):1451-75.
259. Stenberg ESA. Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. 1990;
260. van Kessel G, Geels MJ, de Weerd S, Buijs LJ, de Bruijn MAM, Glansbeek HL, et al. Development and

- qualification of the parallel line model for the estimation of human influenza haemagglutinin content using the single radial immunodiffusion assay. *Vaccine*. janv 2012;30(2):201-9.
261. Squires TM, Messinger RJ, Manalis SR. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnology*. 2008;26(4):417-26.
262. Lynn NS, Špringer T, Slabý J, Špačková B, Gráfová M, Ermini ML, et al. Analyte transport to micro- and nano-plasmonic structures. *Lab on a Chip*. 2019;19(24):4117-27.

Résumé :

Les épidémies saisonnières du virus de la grippe, associées à la menace constante d'une nouvelle pandémie, incitent les fabricants de vaccins à développer des procédés plus réactifs que le procédé traditionnel basé sur l'ovoculture. Bien que les procédés alternatifs développés, basés sur la culture cellulaire, offrent de nombreux avantages ils nécessitent encore des optimisations afin de pouvoir concurrencer sérieusement le processus traditionnel. Ainsi, les autorités régulatrices incitent les fabricants de vaccins à développer des outils analytiques *en-ligne* pour surveiller à la fois les paramètres critiques du procédé (CPP) et les attributs de qualité critiques (CQA) des produits dans les bioprocédés dans le cadre de la démarche *Process Analytical Technology* (PAT). Aujourd'hui, la technique de référence pour le dosage d'activité vaccinale est l'immunodiffusion radiale (SRID). Elle nécessite une production annuelle de réactifs potentiellement critique pour la libération des lots et ne peut pas être mis en œuvre pour du suivi de procédé. Les techniques de quantification physique (TRPS, virométrie, NTA...) récentes apparaissent plus appropriées que les dosages d'infectivité traditionnels pour du suivi *en-ligne* étant donné le ratio entre les particules virales totales et infectieuse de 10-10000. Cependant, ces techniques ne fournissent pas d'information concernant l'activité vaccinale. Au cours de cette thèse a été développé un test analytique pour la quantification de l'hémagglutinine (HA) et de virus bioactifs basé sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi). La méthode est basée sur la capture par affinité de HA par les glycanes possédant une extrémité terminale de type acide sialique. Les conditions ont été optimisées pour offrir une régénération de la surface afin d'effectuer des analyses séquentielles. Des échantillons de vaccin et de virus influenza produits sur diverses plateformes de culture cellulaire ont été analysés avec ce test dans le but d'établir des calibrations. Ce test permet une évaluation rapide (<10 mins) de l'activité de la HA virale avec une gamme analytique large (30 ng HA.mL⁻¹-20 µg HA.mL⁻¹). De plus, la technique offre une limite de détection (LOD) 100 fois inférieure à SRID, ainsi qu'une meilleure reproductibilité que la SRID et ses alternatives potentielles (<3% CV vs 6-15%). Ce test a également permis d'atteindre une LOD de 5.10⁷ particules virales.mL⁻¹. L'applicabilité de ce test pour le suivi de bioprocédés a été validée par l'évaluation de cinétiques de production virales en culture cellulaire, offrant une bonne corrélation avec la concentration en particules virales totales et la quantité totale de protéines HA dans deux lignées cellulaires de production. Nous avons également validé que ce test permettait une évaluation de l'activité d'échantillons de virus entier. Enfin, nous avons conçu et évalué une ligne d'échantillonnage et de purification automatisée pour l'évaluation *en-ligne* des cinétiques de production virales en culture cellulaire aviaire en suspension. Ce travail de thèse a ainsi permis de fournir un outil innovant pour le développement de nouveaux bioprocédés vaccinaux (suivi en-ligne, formulation, études de stabilité), soutenant l'initiative PAT.

Discipline : Biochimie

Mots-clés : Influenza, SPRi, Résonance plasmonique de surface, Vaccin, Bioprocédés, Bioanalytique

Laboratoire : Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires – Equipe GEMBAS

UMR 5246 – Université Claude Bernard Lyon 1 – CNRS – CPE Lyon – INSA Lyon

Bâtiment Lederer – 1 rue Victor Grignard – 69622 Villeurbanne Cedex
