

**Titre:** Optimisation de la production de protéines recombinantes avec des cellules de tabac en suspension  
Title:

**Auteur:** Éric Boivin  
Author:

**Date:** 2010

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Boivin, É. (2010). Optimisation de la production de protéines recombinantes avec des cellules de tabac en suspension [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/263/>  
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/263/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Mario Jolicoeur, Gregory De Crescenzo, & Daniel-Philippe Matton  
Advisors:

**Programme:** Génie chimique  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE PROTÉINES  
RECOMBINANTES AVEC DES CELLULES DE TABAC EN SUSPENSION**

ÉRIC BOIVIN

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILISOPHIAE DOCTOR (Ph.D)

(GÉNIE CHIMIQUE)

MARS 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES  
AVEC DES CELLULES DE TABAC EN SUSPENSION

présentée par : BOIVIN, Éric

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D, membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Grégory, Ph.D, membre et codirecteur de recherche

M. MATTON Daniel-Philippe, Ph.D, membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre

M. SAINSBURY Frank, Ph.D, membre

## DÉDICACE

*À ma mère, mon père et Guillaume*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche, les Pr. Mario Jolicoeur, Grégory De Crescenzo et Daniel P. Matton pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, pour leur encadrement, leurs judicieux conseils et leurs encouragements. Je tiens également à les remercier pour m'avoir apporté une nouvelle vision de la recherche, plus appliquée que celle que mes études antérieures m'ont donnée.

Je souhaite également remercier tous mes collègues de travail pour leur aide, leurs conseils et pour la bonne ambiance qu'ils ont fait régner au laboratoire. J'aimerais particulièrement remercier Steve pour m'avoir transmis tout son savoir en ce qui concerne la culture de cellules de plantes, Mathieu pour les cultures en bioréacteur et le Virgo, Zeina pour les analyses de *Differential display*, et Martin, Hugo et Éric C. pour leur conseils concernant plusieurs méthodes de biologie moléculaire.

J'aimerais également souligner le précieux travail des techniciens, Martine, Gino, Lionel, Michelle, Carol, Jean, Robert qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce projet. De même, j'aimerais remercier le personnel du secrétariat du département de génie chimique, en particulier Louise, Lyne, Chantal F., Chantal B et Brigitte pour leur aide avec les problèmes administratifs et les commandes.

Enfin, un gros merci à mes amis et collègues, en particulier Virginie, Marisha, Jingkui, Cyril, Aline, Antoine, Anne et Ines pour leurs oreilles attentives et leurs encouragements. Un gros merci également à Guillaume, pour le réconfort qu'il m'a apporté, la tranquillité de son condo et sa machine à café.

## RÉSUMÉ

La demande croissante pour des protéines recombinantes à faible coût stimule l'industrie à développer de nouvelles plateformes de production. Parmi celles-ci, la plateforme végétale *in vitro* gagne en intérêt. Permettant l'utilisation d'un milieu de culture entièrement synthétique, exempt de protéines et qui ne favorise pas le développement de pathogènes humains, les cellules de plantes peuvent effectuer des modifications post-traductionnelles et mener à des molécules bioactives. Plusieurs protéines produites en plantes sont d'ailleurs en phase d'essais cliniques. Toutefois, les faibles rendements en protéines recombinantes obtenus avec les cellules de plantes limitent la compétitivité de cette plateforme novatrice.

Les travaux de recherche regroupés dans cette thèse visent l'amélioration des rendements en protéines recombinantes produites par des cellules de tabac en suspension. L'objectif principal a consisté en l'optimisation de la production de protéines recombinantes en cellules de tabac, dans le contexte d'un bioprocédé en bioréacteur. En objectifs spécifiques, la co-culture de cellules de plantes avec *Agrobacterium* permettant d'exprimer de façon transitoire un gène d'intérêt et un suppresseur viral, ainsi que l'identification et l'isolation de promoteurs forts inductibles au froid ont été étudiées.

De manière à présenter une vue globale de la situation actuelle du marché et de l'industrie, une revue détaillée a été réalisée et soumise au journal *Plant Biotechnology Journal* (février 2010). Dans la première partie de cet article, l'ensemble des plateformes de production de protéines recombinantes établies de même que celles en émergence sont décrites en détail et leurs niches spécifiques sont présentées. Par la suite, les innovations récentes rapportées dans la littérature pour la plateforme végétale *in vitro*, telles que l'optimisation des cassettes d'expression

et des paramètres de bioprocédés et l'utilisation de suppresseurs viraux de répression génique sont présentées et discutées.

Dans un deuxième temps, un chapitre présente une étude démontrant la faisabilité de produire des protéines recombinantes de façon transitoire, dans des cellules de plantes en suspension, en les cocultivant avec des populations d'*Agrobacterium* compétentes à transférer des plasmides contenant divers gènes d'intérêt. Il a ainsi été démontré que l'expression transitoire d'un suppresseur viral de répression génique tel que p19, simultanément à l'expression également transitoire d'un gène d'intérêt, augmente de manière significative le rendement en protéines recombinantes. Ces travaux ont été consignés dans un second article soumis au journal *Biotechnology Progress* (février 2010). Plus précisément, des cellules de *Nicotiana benthamiana* ont été cocultivées avec deux souches d'*Agrobacterium* différentes, l'une ayant une construction pour l'expression d'un gène d'intérêt, un anticorps IgG1 de souris, l'autre codant pour le suppresseur viral p19. Ces travaux de coculture transitoire ont permis de démontrer, pour la première fois, que la co-transformation de cellules de plante en suspension avec deux vecteurs de transformation est possible, et que l'utilisation d'un suppresseur viral augmente significativement la production de protéines recombinantes, de manière similaire à ce qui est observé pour des feuilles de la même plante agroinfiltrées. Il a également été déterminé que l'utilisation d'une approche transitoire pour l'expression du suppresseur viral pourrait être préférable à l'établissement d'une lignée exprimant constitutivement le suppresseur. Selon les résultats présentés dans cette thèse, la suppression du mécanisme de répression génique causée par p19 et qui est reliée à son niveau d'expression, pourrait être plus élevée dans le cas transitoire à cause d'un phénomène de surexpression des transgènes (dont p19) en situation transitoire.

Dans un troisième temps, l'identification et l'isolation de promoteurs forts inductibles au froid dans *N. tabacum* ont été initiées. Tel qu'expliqué dans la revue de la littérature, des

systèmes de production inductibles au froid sont présentement en développement dans des cellules microbiennes et de mammifères; le froid étant identifié comme un paramètre pouvant permettre d'augmenter les rendements en protéines actives et correctement repliées, tout en diminuant les actions néfastes des protéases. À notre connaissance, il n'existe pas de système similaire en plante avec une perspective de production de protéines recombinantes. Les cellules de plantes sont normalement cultivées entre 23 et 27°C, et les effets d'un stress à 12°C ou 18°C pendant 6, 12, 24 et 48 heures sur la biomasse et la concentration en protéines ainsi que le pH extracellulaire ont été caractérisés. En utilisant une méthode d'expression différentielle (*Differential Display*), des fragments de la région 3'-non-traduite (UTR) de quelques gènes potentiellement induits au froid ont été isolés. La validation de ces candidats a été initiée en utilisant des analyses Northern et Northern inversé, mais n'a pas résulté, à ce jour, à l'identification claire de promoteurs candidats. Les bases de données existantes ont été criblées en utilisant une stratégie de BLAST; ce qui a permis de réduire le nombre de nos candidats potentiels. Une méthode d'amplification rapide du bout 5' de l'ADN complémentaire (5'-RACE) a été réalisée sur les candidats ciblés afin d'augmenter la longueur de la séquence connue des gènes. Toutefois, aucun des fragments isolés avec cette méthode n'étaient reliés aux candidats retenus. Les travaux effectués sont donc présentés afin de guider d'éventuels travaux sur ce sujet.

Dans cette thèse, la faisabilité d'un système d'expression transitoire, combinant des cellules de plantes avec plusieurs lignées d'*Agrobacterium* a été démontrée de même que l'importance d'exprimer de manière transitoire un suppresseur viral pour augmenter les rendements en protéines recombinantes. Toutefois, beaucoup de travail demeure à faire en ce qui concerne l'identification et l'isolation de promoteurs inductibles au froid.



## ABSTRACT

The continuously increasing demand for bioactive recombinant proteins at low cost stimulates the industry to develop new production platforms. Among them, *in vitro* plant biotechnology is gaining interest. Allowing the use of a fully synthetic protein-free medium that do not promote the development of human pathogens, plant cells can perform post-translational modifications and lead to bioactive therapeutics. Various human proteins produced in plant cell cultures are currently under clinical trials. However, low recombinant protein yields obtained with plant cells limit the competitiveness of this new platform.

The research in this thesis is aimed at raising recombinant protein yields from tobacco cells in suspensions. The main objective was to optimize recombinant protein production in tobacco cells in a bioreactor process. Secondary objectives were to study plant cell coculture with *Agrobacterium* to transiently express a gene of interest and a viral suppressor and to identify and isolate strong cold-inducible promoters.

In order to present an overview of the actual situation in the industry, an exhaustive literature review was produced and submitted to the Plant Biotechnology Journal (February 2010). In the first part of this review manuscript, all the established recombinant protein production platforms as well as the main emerging platforms are described in detail with their specific applications. Upcoming innovations for the *in vitro* plant biotechnology platform such as the optimization of expression cassettes, of bioprocess parameters and the use of viral suppressors are then presented and discussed.

In a second part, a chapter presents a study showing the feasibility of transiently producing recombinant proteins, in plant cells in suspension, by cocultivating them with

*Agrobacterium* populations capable of transferring plasmids containing various genes of interest. It was shown that transiently expressing a viral suppressor like p19 and a gene of interest simultaneously significantly raises recombinant protein yields. The second manuscript, submitted to *Biotechnology Progress* (February 2010), presents a study on these two complementary approaches. *Nicotiana benthamiana* cells were cocultivated with two different *Agrobacterium* strains, one bearing a construct for the expression of a gene of interest, a murine IgG1, and the other one bearing the viral suppressor p19. Using this coculture transient system, it was shown that co-transformation of plant cell suspension culture with two transformation vectors is feasible and that the use of a viral suppressor of silencing significantly raises the recombinant protein production similarly to what is observed in agroinfiltrated plant leaves. It was also showed that using a transient approach for the expression of the viral suppressor may be preferable to the establishment of a stably expressing cell line due to the fact that the silencing suppressor effect of p19 is related to its expression level and that this level was significantly lower in the stable cell line than in the transiently transformed one.

In parallel to transient cocultures, the identification and isolation of strong and cold-inducible promoters in *N. tabacum* was attempted. As shown in the review manuscript, cold-induced production systems are being developed in microbial and mammalian cells; cold being identified as a parameter allowing a raise of active and correctly folded recombinant protein while reducing the work of proteases. No such system has, to our knowledge, been made for plant systems in a perspective of recombinant protein production. Plant cells are normally grown between 23-27 °C and the effects of a cold stress at 12°C or 18°C for 6, 12, 24 and 48 hours on plant biomass, total extracellular protein concentration and pH were characterized. Using a Differential Display approach, fragments of the 3'-untranslated region (UTR) of anumber of potential cold-inducible genes have been isolated. Validation of these candidates has been

attempted using Northern or Reverse Northern blots with no results. Databases were screened using a BLAST strategy, and allowed a reduction to a few potential candidates. A 5'-Rapid Amplification of cDNA ends (5'-RACE) method was performed on these candidates in order to get a longer gene sequence. However, none of the isolated fragments using this method were related to the candidates.

In this thesis, the feasibility of a transient expression system that combines plant cells with many *Agrobacterium* strains was demonstrated as well as the importance to transiently express a viral suppressor in order to raise recombinant protein yields. However, much work remains to be done in the identification and isolation of cold-inducible promoters.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DÉDICACE.....</b>	<b>iii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xix</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION, PROBLÉMATIQUE ET ORGANISATION DE LA THÈSE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2 : NOUVELLES PERSPECTIVES POUR LA MOLÉCULTURE <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>7</b>
2.1 Présentation de l'article.....	7
2.2 New perspectives for <i>in vitro</i> molecular farming.....	8
2.2.1 Abstract.....	8
2.2.2 Introduction .....	9
2.2.2.1 A continuously increasing demand for recombinant protein.....	9
2.2.2.2 Overview of the current production platforms and their specific niche .....	11
2.2.2.2.1 Bacterial platforms.....	13
2.2.2.2.2 Fungal platforms .....	19
2.2.2.2.2.1 Yeasts .....	19

2.2.2.2.2 Filamentous fungi.....	22
2.2.2.2.3 Animal platforms .....	25
2.2.2.2.3.1 Insect cells .....	26
2.2.2.2.3.2 Mammalian cells .....	29
2.2.2.2.4 Plant platforms .....	34
2.2.2.2.4.1 Hairy roots.....	37
2.2.2.2.4.2 Cells suspensions.....	38
2.2.3 The Challenges of <i>in vitro</i> molecular farming .....	42
2.2.3.1 Optimization of the expression cassette.....	43
2.2.3.2 Use of viral suppressors.....	48
2.2.3.3 Bioprocess optimization .....	49
2.2.3.3.1 Bioreactor configurations.....	52
2.2.3.3.2 Addition of compounds to prevent protein loss and proteolysis.....	57
2.2.4 Conclusion and future trends .....	61
2.2.5 Acknowledgements.....	61
2.2.6 References.....	62
<b>CHAPITRE 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....</b>	<b>88</b>
3.1 Hypothèses .....	88
3.2 Objectifs .....	88
<b>CHAPITRE 4: L'EXPRESSION D'ANTICORPS DE FAÇON TRANSITOIRE PAR DES CELLULES DE PLANTES EN SUSPENSION EST AMÉLIORÉE LORSQU'ELLES SONT COCULTIVÉES AVEC LE SUPPRESSEUR VIRAL P19 .....</b>	<b>92</b>
4.1 Présentation de l'article.....	92

4.2 Transient expression of antibodies in suspension plant cells culture is enhanced when co-transformed with the viral suppressor of silencing p19 .....	93
4.2.1 Abstract.....	93
4.2.2 Introduction .....	94
4.2.3 Experimental procedures .....	97
4.2.3.1 Plant cell line development.....	97
4.2.3.2 General plant cell suspension culture .....	97
4.2.3.3 Development of a stable p19 expressing <i>N. benthamiana</i> cell line .....	98
4.2.3.4 PCR analyses .....	98
4.2.3.5 Agroinfiltration of plants .....	100
4.2.3.6 Co-culture of plant cells and <i>Agrobacterium</i> .....	101
4.2.3.7 Protein extraction for analysis .....	102
4.2.3.8 Measurement of IgG1 by ELISA.....	103
4.2.3.9 Glucose concentration determination .....	103
4.2.3.10 qPCR analysis .....	103
4.2.4 Results and discussion.....	105
4.2.4.1 Dual agroinfiltration of <i>N. benthamiana</i> plants with both p19- and IgG1-containing <i>A. tumefaciens</i> bacterial strains significantly enhances IgG1 production in leaves .....	105
4.2.4.2 Effects of co-cultivating <i>N. benthamiana</i> suspension cells with <i>A. tumefaciens</i> ...	107
4.2.4.3 IgG1 Accumulates in plant cells in culture.....	112
4.2.4.4 Approaches to improve co-culture productivity in recombinant protein.....	119
4.2.5 Conclusions .....	121
4.2.6. Acknowledgements .....	122

4.2.7 References .....	123
<b>CHAPITRE 5: ISOLEMENT DE PROMOTEURS INDUCTIBLES AU FROID</b>	
<b>CHEZ N. TABACUM .....</b>	<b>128</b>
5.1 Introduction .....	128
5.2 Matériel et méthode .....	131
5.2.1 Culture générale des cellules en suspension de <i>Nicotiana tabacum</i> (NT1) .....	131
5.2.2 Stress d'exposition des cellules au froid .....	132
5.2.3 Extraction d'ARNs totaux .....	133
5.2.4 Expression différentielle ( <i>Differential Display</i> ) .....	133
5.2.5 Analyse Northern et Northern inversé (Reverse Northern) .....	136
5.2.6 Analyse qPCR .....	138
5.2.7 5'-RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ) .....	140
5.3. Résultats et discussion .....	142
5.3.1 Un stress au froid affecte peu la croissance et la viabilité des cellules de plante .....	142
5.3.2 Sélection de gènes candidats par analyses d'expression différentielle .....	149
5.3.3 Analyse Northern et Northern inverse .....	149
5.3.4 Analyse qPCR .....	155
5.3.5 Analyses BLAST .....	158
5.3.6 5'-RACE .....	160
5.4. Conclusions et perspectives .....	167
<b>CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>170</b>
<b>CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>178</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>207</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 2.1</b> Number of biopharmaceuticals for human use produced in the different platforms.....	10
<b>Table 2.2</b> Comparison of the major platforms used to produce recombinant proteins .....	12
<b>Table 2.3</b> Detailed list of recombinant proteins in development in plant cells .....	39
<b>Table 2.4</b> Main viral suppressors used in research to increase protein production .....	50
<b>Tableau 5.1</b> Résumé des tailles des fragments isolés lors des analyses d'expression différentielle .....	152
<b>Tableau 5.2</b> Résumé des résultats obtenus avec les analyses BLAST des fragments obtenus par <i>Differential Display</i> .....	159
<b>Tableau 5.3</b> Résumé des tailles des fragments isolés lors des analyses 5'-RACE .....	162
<b>Tableau 5.4</b> Résumé des résultats obtenus avec les analyses BLAST des fragments obtenus par 5'-RACE .....	165



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 2.1</b> Recombinant protein products on the market per production platform.....	14
<b>Figure 2.2</b> Description of the development and scale-up of the major <i>in vitro</i> platforms .....	15
<b>Figure 4.1</b> Validation of the established <i>N. benthamiana</i> cell line expressing the viral suppressor p19.....	99
<b>Figure 4.2</b> Concentration and accumulation rate of cellular IgG1 in agroinfiltrated <i>N. benthamiana</i> leaves.....	106
<b>Figure 4.3</b> Growth of <i>N. benthamiana</i> suspension cells co-cultured with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	108
<b>Figure 4.4</b> Concentration of total extracellular protein in culture media for <i>N. benthamiana</i> suspension cells co-cultured with <i>A. tumefaciens</i> .....	111
<b>Figure 4.5</b> Concentration and accumulation rate of cellular IgG1 for <i>N. benthamiana</i> suspension cells co-cultured with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	113
<b>Figure 4.6</b> Concentration of extracellular IgG1 for <i>Nicotiana benthamiana</i> suspension cells co-cultured with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	115
<b>Figure 4.7</b> <i>N. benthamiana</i> suspension cells co-cultured with <i>A. tumefaciens</i> .....	118
<b>Figure 5.1.</b> Suivi de l'impact sur la croissance des cellules de <i>Nicotiana tabacum</i> NT1 de l'exposition à une température de 12 °C.....	143
<b>Figure 5.2.</b> Suivi de l'impact sur la croissance des cellules de <i>Nicotiana tabacum</i> NT1 de l'exposition à une température de 18 °C.....	145
<b>Figure 5.3.</b> Suivi de l'impact d'une température inférieure à la température optimale sur la concentration protéique extracellulaire de cellules de <i>Nicotiana tabacum</i> NT1 .....	146

<b>Figure 5.4.</b> Suivi de l'impact d'une température inférieure à la température optimale sur le pH extracellulaire de cellules de <i>Nicotiana tabacum</i> NT1 .....	148
<b>Figure 5.5.</b> Patron de bandes obtenu lors de la première analyse d'expression différentielle ( <i>Differential Display</i> ) avec l'oligo-dT (A).....	150
<b>Figure 5.6.</b> Patron d'expression des 24 candidats isolés lors des analyses d'expression différentielle avec les oligo-dT (A), (G) et (C).....	151
<b>Figure 5.7.</b> Analyse Northern de huit candidats de gènes induits au froid.....	154
<b>Figure 5.8.</b> Analyse Northern inversée (Reverse Northern) de tous les candidats de gènes induits au froid .....	156
<b>Figure 5.9.</b> Analyse qPCR.....	157
<b>Figure 5.10.</b> Amplification PCR sur colonies des fragments insérés dans le vecteur TOPO avec les amorces T3/T7.....	163
<b>Figure 5.11.</b> Résultats des premier et deuxième PCR du deuxième essai de RACE pour les quatre candidats ayant montré une similitude par analyse BLAST avec des gènes induits au froid .....	166

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1.</b> Detailed list of recombinant protein drugs on the market and discontinued per production platform.....	207
<b>Annexe 2.</b> Séquences complètes des fragments isolés lors des analyses de <i>Differential Display</i> .....	225
<b>Annexe 3.</b> Séquences complètes des fragments isolés lors du 5'-RACE .....	234
<b>Annexe 4.</b> Procédure d'opération normalisée pour la transformation de cellules de plantes .....	240

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AYVV : Ageratum Yellow Vein Virus

BeYDV : Bean Yellow Dwarf Virus

BHK cells : Baby Hamster Kidney cells

BSA: Bovine Serum Albumin

CaPi: Calcium-Phosphate

cGMP: current Good Manufacturing Practices

CHO cells : Chinese Hamster Ovary cells

CPMV: Cowpea Mosaic Virus

DEPC: Diethyl Pyrocarbonate

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DSP: Downstream Processing

DW: Dry Weight

EDTA: Ethylene Diamine TetraAcetic Acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMA: European Medicines Agency

EPO: Erythropoietin

EST: Expressed Sequence Tag

EtOH: Ethanol

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drug Administration

FQRNT: Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies

FW: Fresh Weight

GAP: Good Agricultural Practices

GFP: Green Fluorescent Protein

GlcNAC: N-Acetyl glycosamine

GRAS: Generally Recognized As Safe

GSP: Gene Specific Primer

HEK: Human Embryonic Kidney cells

hGM-CSF: human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor

HSP: Heat Shock Protein

IgG: Immunoglobuline G

IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside

KIN: Kinetin

mAb: Monoclonal Antibody

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

MS: Murashige-Skoog

NAA:  $\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid

OUR: Oxygen Uptake Rate

PBS: Phosphate Buffer Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCV: Packed Cell Volume

PEG: Polyethylene Glycol

PEI: Polyethylenimine

PTGS : Post-transcriptional Gene Silencing

PVP: Polyvinylpyrrolidone

PVX: Potato Mosaic Virus

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends

SCV: Sedimented Cell Volume

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SeAP: Secreted Alkaline Phosphatase

SPR: Surface Plasmon-Resonance

SSC: Saline Sodium Citrate

T-DNA: Transfer DNA

TE: Tris-EDTA

Ti: Tumor inducing

TMB: Tetramethylbenzidine

TMV: Tobacco Mosaic Virus

ToMV: Tomato Mosaic Virus

TSP: Total Soluble Protein

UTR: Untranslated Region

U.V.: Ultraviolet

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION, PROBLÉMATIQUE ET ORGANISATION DE LA THÈSE

Depuis le début des années 80, les composés thérapeutiques à base de protéines se sont distingués en tant que catégorie de molécules ayant la croissance la plus rapide dans l'industrie pharmaceutique (Walsh, 2003). On prévoit que d'ici la fin de l'année 2010, le marché des composés biopharmaceutiques, qui inclut les protéines recombinantes, les peptides et les produits à base d'acides nucléiques, devrait atteindre 70 milliards de dollars américains (Walsh, 2006). Les premières protéines recombinantes, l'insuline et l'hormone de croissance humaine, étaient à l'origine produites dans des plateformes microbiennes, principalement avec *E. coli* (Jana and Deb, 2005). Bien que ces plateformes se soient montrées adéquates pour la production de petites protéines, les défis associés aux protéines plus complexes et/ou glycosylées ont poussé l'industrie à développer des plateformes eucaryotes, telles que celle utilisant des cellules d'ovaire de hamster chinois (*Chinese Hamster Ovary*: CHO) (Walsh, 2005). Toutefois, les plateformes utilisant des cellules de mammifères ont d'importantes limitations, telles que le risque d'une présence de pathogènes pour les humains (prions et virus). Afin de diminuer ce risque, l'industrie a mis au point des milieux de culture définis sans sérum (constituant une source potentielle majeure de pathogènes) ce qui a entraîné une augmentation substantielle des coûts (pouvant atteindre 100\$ le litre). Par conséquent, bien que la culture de cellules mammifère soit présentement bien établie en tant que plateforme principale de production industrielle pour les protéines recombinantes, d'autres plateformes utilisant des cellules eucaryotes offrent maintenant des alternatives intéressantes. Parmi celles-ci, la moléculature, utilisant des plantes entières ou des cellules en suspension gagne en intérêt. Avec ces plateformes végétales, deux approches de

production sont possibles; soit en utilisant des lignées transgéniques établies, ou en exprimant le transgène d'intérêt de façon transitoire pour une production ponctuelle. L'utilisation de plantes transgénique en champ est toutefois sujette aux conditions climatique (Miele, 1997) et à une contamination potentielle avec des herbicides et/ou fongicides ce qui, en plus de compliquer les étapes de purification, peut avoir un impact sur les rendements et leur reproductibilité (Fitzgerald, 2003). De plus, elle est généralement mal perçue par le public. L'alternative en mode transitoire est généralement réalisée par agroinfiltration, une technique où une suspension de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* contenant un vecteur d'expression codant pour le gène d'intérêt est infiltrée dans les feuilles de la plante hôte (Horn et al., 2004). Les bactéries transfèrent ensuite le vecteur d'expression aux cellules de plante et la protéine d'intérêt est produite pour une période oscillant entre 6 et 14 jours (Huang and McDonald, 2009). Les rendements obtenus en mode transitoire sont généralement supérieurs à ceux obtenus avec des lignées stables en raison de la présence de plusieurs copies épisomales du transgène dans les cellules (Gleba et al., 2007). La plateforme végétale *in vitro* est, quant à elle, particulièrement intéressante en raison du faible coût du milieu de culture qui y est associé ( $\leq 10\text{¢/L}$ ) et du fait que, en plus d'être exempte de prions et de virus pathogènes aux humains (Miele, 1997), tous les paramètres de culture peuvent être contrôlés ce qui permet une meilleure reproductibilité (Shih and Doran, 2009). Si la protéine d'intérêt est sécrétée par les cellules dans le milieu de culture, cette plateforme a un avantage économique en réduisant de façon considérable les coûts liés à l'extraction et à la purification des protéines recombinantes (Doran, 2000). Jusqu'à très récemment, seules des lignées stables étaient cultivées en bioréacteur pour produire des protéines recombinantes, mais un groupe de recherche a démontré la possibilité de cocultiver des cellules de plante et d'*Agrobacterium* pour produire de façon transitoire une protéine d'intérêt *in vitro* (Andrews and Curtis, 2005; Collens et al., 2004). Il s'agit donc d'une nouvelle avenue intéressante pour cette plateforme. Toutefois,



bien qu'un vaccin à usage vétérinaire produit en cellule de tabac par la compagnie DowAgroScience ait été approuvé en 2006 et que plusieurs autres protéines recombinantes produites en plante soient en phase d'essais précliniques ou cliniques, l'utilisation de cette plateforme végétale *in vitro* demeure marginale (Griesbeck et al., 2006). Ceci peut être, en partie, expliqué par les faibles rendements généralement obtenus avec les cellules de plantes qui sont de l'ordre de 0.01 à 0.2 g/L, ce qui nuit à sa compétitivité par rapport aux autres plateformes. En effet, les plateformes microbiennes (bactéries et levures) et mammifère ont été continuellement améliorées pendant les trois dernières décennies. Par conséquent, les rendements moyens actuels pour *E. coli* se situent entre 0,5 et 5 g/L, entre 0,1 et 2 g/L pour les levures (*S. cerevisiae*) et entre 1 et 3 g/L pour les cellules mammifères (Huang and McDonald, 2009). Il y a donc un intérêt certain à poursuivre la recherche dans le domaine végétale afin d'augmenter la productivité des cellules de plante.

Plusieurs stratégies ont été développées pour tenter d'améliorer les rendements des plateformes végétales, tant en plantes entières qu'en culture *in vitro*. Parmi celles-ci, on retrouve l'amélioration des cassettes d'expression, le développement de vecteurs viraux, l'utilisation de suppresseurs viraux de répression génique, l'optimisation des bioprocédés de culture et de récupération de la protéine d'intérêt ainsi que la mise au point d'outils tels que des modèles mathématiques, des sondes et des bioréacteurs divers. Bien qu'une revue de littérature traitant de l'ensemble de ces sujets ait été réalisée et constitue le second chapitre de cette thèse, la suite des travaux a été concentrée sur l'utilisation de suppresseurs viraux et sur l'amélioration des cassettes d'expression.

Dans les premières années du développement de plantes transgéniques, un phénomène appelé cosuppression a été découvert. Les plantes transgéniques affectées par la cosuppression perdent leur capacité à exprimer les transgènes. Ce mécanisme, présent chez tous les eucaryotes,

a par la suite été renommée répression génique post-transcriptionnelle (PTGS : Post-Translational Gene Silencing) (Voinnet, 2009). Il s'agirait en fait d'un système de défense contre les attaques des virus (Ratcliff et al., 1999). Dans une cellule de plante transformée génétiquement, le transgène produit de nombreuses copies de son ARN messenger, ce qui s'apparente à une infection virale. Le système de répression génique des plantes entraîne la dégradation de ces ARNs messagers et empêche donc par la même occasion la synthèse de la protéine recombinante. Il s'agit d'une des raisons majeures des faibles rendements en protéines recombinantes observés chez les plantes. Certains virus ont toutefois développé des protéines capables d'interférer avec ce système et permettre la réplication non-limitée de virus, d'où leur appellation de supresseurs viraux. p19, provenant du *tomato bushy stunt virus*, est le premier à avoir été identifié, isolé et exploité (Voinnet et al., 2003). Il a d'ailleurs été démontré que sa coexpression dans les feuilles de plantes pouvait augmenter significativement (jusqu'à 50 fois) la quantité de protéines recombinantes produites (Voinnet et al., 1999; Voinnet et al., 2003). L'utilisation de supresseurs viraux est maintenant une pratique commune lorsque des protéines recombinantes sont produites en plante.

Tel que mentionné précédemment, il a été démontré qu'il était possible de produire des protéines recombinantes de façon transitoire en cocultivant des cellules de plantes et de cellules d'*Agrobacterium*. Les travaux regroupés au chapitre 4 de cette thèse s'appuient sur cette approche d'expression transitoire, et propose d'utiliser en plus et de façon originale un supresseur viral afin de vérifier si une hausse significative des rendements en protéines recombinantes similaire à ce qui est obtenu en feuilles est observable.

L'amélioration des cassettes d'expression est également une alternative intéressante pour augmenter la productivité des cellules de plante. Chacun des éléments constituant la cassette, les régions non-traduites 5' et 3', le promoteur et la séquence des codons du gène d'intérêt, a un

impact sur la production de la protéine recherchée. Les promoteurs sont les éléments responsables du contrôle de l'expression des gènes et un promoteur fort permet souvent de compenser si l'ARN messager produit est instable, faiblement traduit ou lorsque la protéine a un court temps de demi-vie (Mirksch et al., 2005). À l'inverse d'un promoteur inductible dont le contrôle peut être effectué à l'aide de stress divers, l'expression d'un promoteur constitutif est généralement reliée à la croissance des cellules (Corrado and Karali, 2009). Les promoteurs inductibles sont en général préférés puisqu'ils permettent de réduire la charge métabolique imposée aux cellules séparant les phases de croissance cellulaire et de production (Huang and McDonald, 2009). Ceci permet généralement d'obtenir une meilleure uniformité des protéines recombinantes formées en réduisant la quantité de protéines dégradées partiellement en raison d'un séjour écourté dans les cellules ou le milieu de culture. Sous ces promoteurs, l'expression du gène d'intérêt peut être contrôlée à l'aide de composés chimiques ou de stress métaboliques ou abiotiques tels que la lumière et la température. Parmi ces stress, l'exposition des cellules à une température plus froide que leur température optimale de croissance constitue une avenue très prometteuse. En effet, il a été démontré que, bien que le froid ralentisse l'ensemble des mécanismes cellulaires dont ceux impliqués dans la production de protéines recombinantes, les rendements finaux en protéines recombinantes correctement repliées et bioactives peuvent être supérieurs à ceux obtenus à la température optimale des cellules (Mujacic et al., 1999). Plusieurs vecteurs d'expression utilisant des promoteurs inductibles au froid ont d'ailleurs été développés ou le sont présentement pour les bactéries (Le and Schumann, 2007; Mujacic et al., 1999), les levures (Sahara et al., 2002) et les cellules mammifères (Al-Fageeh et al., 2005), mais aucun n'ont à ce jour été rapportés pour les plantes. L'utilisation d'un tel promoteur avec des cellules de plante cultivées en bioréacteur aurait un avantage particulier pour cette plateforme puisqu'une exposition au froid augmente la solubilité de l'oxygène dans le milieu; ce qui permet de réduire le

débit de bullage, et par conséquent, de minimiser la formation de mousse; un problème récurrent avec les cellules de plantes. La seconde partie expérimentale des travaux de recherche effectués dans cette thèse a donc été concentrée sur l'identification et l'isolation de promoteurs inductibles au froid chez *N. tabacum* avec pour objectif de développer des vecteurs d'expression inductibles au froid.

Cette thèse est donc organisée en sept chapitres distincts. Après cette introduction générale, une présentation détaillée des plateformes actuelles et émergentes utilisées pour la production de protéines recombinantes ainsi qu'une description des innovations récentes permettant d'augmenter les rendements de la plateforme végétale *in vitro* en particulier, constituent le chapitre 2. Cette revue de littérature constitue un premier manuscrit qui a été soumis dans le cadre de cette thèse. Le chapitre 3 décrit ensuite les hypothèses et les objectifs qui ont guidé les travaux réalisés. Il est suivi des chapitres 4 et 5 qui présentent les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. Le chapitre 4, constituant le second manuscrit soumis, décrit les travaux portant sur l'étude d'une transformation transitoire des cellules de plante en suspension avec plusieurs souches d'*agrobacterium* en parallèle. Le chapitre 5 présente, quant à lui, les travaux réalisés visant l'identification et l'isolation de promoteurs de tabac inductibles au froid. Des alternatives aux problèmes rencontrés dans ces travaux sont également proposées. Finalement, les chapitres 6 et 7 présentent respectivement une discussion générale et une conclusion générale et les recommandations.

## **CHAPITRE 2 : NOUVELLES PERSPECTIVES POUR LA MOLECULTURE *IN VITRO***

### **2.1 Présentation de l'article**

Ce premier article, sous forme d'une revue, rassemble l'ensemble de la littérature pertinente aux sujets développés dans cette thèse, soit l'amélioration de la production de protéines recombinantes par la plateforme végétale *in vitro*. Il a été soumis pour publication au Plant Biotechnology Journal au mois de février 2010. Selon la littérature ainsi que les tendances observées dans le milieu industriel, la plateforme végétale *in vitro* semble très prometteuse pour la production de protéines recombinantes à des fins thérapeutiques. Afin de pouvoir bien évaluer les avantages de cette plateforme, une description détaillée des plateformes microbiennes et mammifères présentement utilisées par l'industrie est rapportée de même que certaines autres plateformes émergentes. Par la suite, l'article se concentre sur les innovations récentes développées pour augmenter les rendements de la plateforme végétale *in vitro* et les rendre compétitifs face aux rendements des plateformes industrielles actuelles. Parmi ces innovations, on retrouve l'amélioration des cassettes d'expression, l'utilisation de suppresseurs viraux de répression génique, l'optimisation des bioprocédés de culture et de récupération de la protéine d'intérêt ainsi que la mise au point d'outils divers reliés aux bioprocédés de production tels que des modèles mathématiques, les bioréacteurs et les sondes diverses.

## 2.2 New perspectives for *in vitro* molecular farming

### 2.2.1 Abstract

The continuously increasing demand for bioactive recombinant proteins at low cost has stimulated the development of new production platforms. Among them, *in vitro* plant biotechnology is gaining in interest for its various advantages over current production platforms such as microbial and mammalian cells. Plant cells can perform post-translational modifications and lead to bioactive therapeutics of human origin, and various human proteins produced in plant cell cultures are currently under clinical trials. With the use of a totally defined protein and amino acid-free medium that do not promote the development of human pathogens, *in vitro* plant molecular farming bioprocesses represent a low cost avenue to produce highly complex biomolecules such as recombinant proteins. This review thus aims at drawing the current state of developed technologies related to *in vitro* plant biotechnology platforms as well as forecasting upcoming innovations. Firstly, prokaryotic and mammalian cells platforms are presented and their specific niches are discussed. Then, the use of transgenic plants is described, followed by the presentation of current *in vitro* plant cell platforms in bioreactors. The various strategies developed to maximize protein production in plants and plant cells are also presented and described. A special attention has been placed on the development of efficient expression cassettes using *Agrobacterium tumefaciens* and viral vectors for the establishment of stable transformants as well as for transient expression strategies. The various cultivation methods in bioreactor are described as well as monitoring and mathematic modeling tools enabling to improve the productivity and the reproducibility of these bioprocesses.

### 2.2.2 Introduction

#### 2.2.2.1 A continuously increasing demand for recombinant proteins

Since the early eighties, protein-based therapeutics have emerged as the fastest growing class of compounds within the pharmaceutical industry (Walsh, 2003). The market for recombinant proteins such as antibodies and growth factors for research, diagnostic and therapeutic use has continuously increased and has reached 50 billion dollars (Kamarck, 2006). Biopharmaceuticals, which include recombinant proteins, peptides, and nucleic acid-based products, now account for more than 20 % of all newly released pharmaceuticals (Jungbauer, 2007b). Furthermore, with

174 recombinant protein products actually on the market (Table 2.1), this specific market is expected to reach 70 billion dollars by the end of 2010 (Walsh, 2006).

The first commercialized recombinant proteins, insulin and human growth hormone (Annexe 1), were originally produced in microbial cell platforms, mainly based on *E. coli* (Jana and Deb, 2005). Whereas these platforms were demonstrated to be adequate for producing fully bioactive insulin and growth hormone (Group, 2003), challenges associated with more complex and/or highly glycosylated proteins have stimulated the industry to move to eukaryotic cells such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (Walsh, 2005). Within the last decade, tremendous progress has allowed for production levels to exceed the gram-per-litre frontier (Kumar et al., 2006; Wurm, 2004). However, mammalian cell platforms still suffer from several limitations, such as the risk associated to the potential presence of human pathogens (prions and viruses), which has increased the cost of defined culture media (close to \$100 per litre), without any sera. Therefore, while mammalian cell culture is currently well-established as an industrial production platform for recombinant proteins, other eukaryotic cell platforms now offer an interesting alternative to

**Table 2.1. Number of biopharmaceuticals for human use produced in the different platforms <sup>1</sup>**

<b>Platforms</b>	<b>Products on the market</b>	<b>Products discontinued</b>	<b>Total</b>	<b>% of the market</b>	<b>% of total products</b>
<b>Bacteria</b> <i>E. coli</i>	49	7	56	28.2	28.7
<b>Yeast</b> <i>S. cerevisiae</i>	34	7	41	19.5	21.0
<b>Filamentous fungi</b> <i>A. niger, T. reesei</i>	0	0	0	0.00	0.00

<b>Mammalian cell</b> CHO, Hybridomas	89	7	96	51.1	49.2
<b>Transgenic Animals</b> Goat	1	0	1	0.6	0.5
<b>Insect cells</b> <i>T. ni</i>	1	0	1	0.6	0.5
<b>Transgenic Plants</b> <i>N. benthamiana</i>	0	-	-	-	-
<b>Plant cells</b> <i>N. tabacum</i>	0	-	-	-	-
<b>Total:</b>	<b>174</b>	<b>21</b>	<b>195</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

<sup>1</sup>: Products with identical active ingredient (recombinant molecule) but with a different brand name were counted separately since they were probably produced by different companies and their formulation may be different.



the animal cell platform. Among them, *in vitro* plant molecular farming is gaining interest as a low-cost (medium  $\leq 10\text{¢/L}$ ), prion- and human virus-free alternative (Ma et al., 2003; Miele, 1997). In that respect, it has been demonstrated that plants and plant cells can produce recombinant human proteins that are similar to those obtained in murine cell system (Ma et al., 2003). There are currently many proteins produced in plants and plant cells that are commercially available for diagnostics and analyses applications as well as for the veterinary markets, which have lower levels of regulatory constraints (Griesbeck et al., 2006), and that are under clinical trials as therapeutics. Although there are slight differences in the glycosylation profile of recombinant proteins produced in plants compared to that of the original human proteins (Gomord et al., 2004), these differences do not usually affect protein bioactivity (Walsh, 2005).

In this review, each production platform (microbial, animal and plant) is discussed by defining its specific niche (Maras et al., 1999) according to its capacity to lead to low-cost bioactive biopharmaceuticals in a highly competitive market (Ben-Maimon and Garnick, 2006; Jungbauer, 2007). The microbial and the animal cell platforms are presented first, followed by the *in vitro* plant cell platforms (Table 2.2).

#### **2.2.2.2 Overview of the current platforms and their specific niches**

The selection of a protein expression system has to be based on a series of constraints that are dictated from the ultimate use of the product, and this is not necessarily related to the ease of the production process (Gerngross, 2004). Criteria on the bioprocess side, such as cell growth rate, high expression level, intracellular and extracellular expression capacity, as well as on the cell side, such as post-translational modifications and glycosylation profile (i.e. biological activity) of

**Table 2.2 Comparison of the major platforms used to produce recombinant proteins**

Platforms	Advantages	Disadvantages
<b>Bacteria</b> Average yield: 0.5-5g/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low production cost</li> <li>- Easy scale-up</li> <li>- High cell density up to 175 gDW/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unable to perform post-translational modifications</li> <li>- Form inclusion bodies</li> <li>- Produce endotoxins</li> <li>- Secretion difficult</li> </ul>
<b>Fungi</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Yeasts</li> </ul> Average yield: 0.1-2 g/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low production cost</li> <li>- Easy scale-up</li> <li>- High cell density up to 130 gDW/L</li> <li>- Can carry post-translational modifications</li> <li>- Can secrete recombinant proteins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>N</i>-glycosylation is of high-mannose type</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filamentous fungi</li> </ul> Average yield: < 1 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low production cost</li> <li>- Easy scale-up</li> <li>- Can carry post-translational modifications</li> <li>- Generally recognized as safe (GRAS)</li> <li>- Can secrete recombinant proteins</li> </ul>
<b>Animals</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insect cells</li> </ul> Average yield: 0.1-2 g/L  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mammalian cells</li> </ul> Average yield: 1-3 g/L  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transgenic animals</li> </ul> Average yield: 1- 10 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Can carry post-translational modifications</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potential risk of presence of arboviruses</li> <li>-<i>N</i>-glycans have paucimannosidic structures and the potentially allergenic Fucose <math>\alpha</math>1,3</li> <li>- Presence of many proteases</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Can carry post-translational modifications</li> <li>- Glycosylation almost identical to humans</li> <li>- Can secrete recombinant proteins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High production cost (medium)</li> <li>- Possible contamination with human pathogens</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Can carry post-translational modifications</li> <li>- Glycosylation almost identical to humans</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ethical problems with using animals</li> <li>- Long process before having productive animals</li> <li>- High production and maintenance cost</li> </ul>
<b>Plants</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hairy roots culture</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cells suspension</li> </ul> Average yield 0.01-0.2 g/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High genetic stability</li> <li>- Can be used at large scale</li> <li>- Possibility to secrete the produced protein</li> <li>- Possibility to establish a frozen stock of cell lines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibility of heterogeneity of products due to heterogeneity of tissue</li> <li>- Low growth rate</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low production cost (medium)</li> <li>- High cell density (80-90 % PCV)</li> <li>- Good control over culture parameters</li> <li>- Possibility to establish a frozen stock of cell lines</li> <li>- GMOs confinement</li> <li>- Possibility of protein secretion</li> <li>- Can carry post-translational modification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low productivity of the cells</li> </ul>

the protein of interest, in addition to the regulatory issues, are to be considered (Baneyx, 1999b). Each production platform has its specific niche (Mayfield et al., 2007).

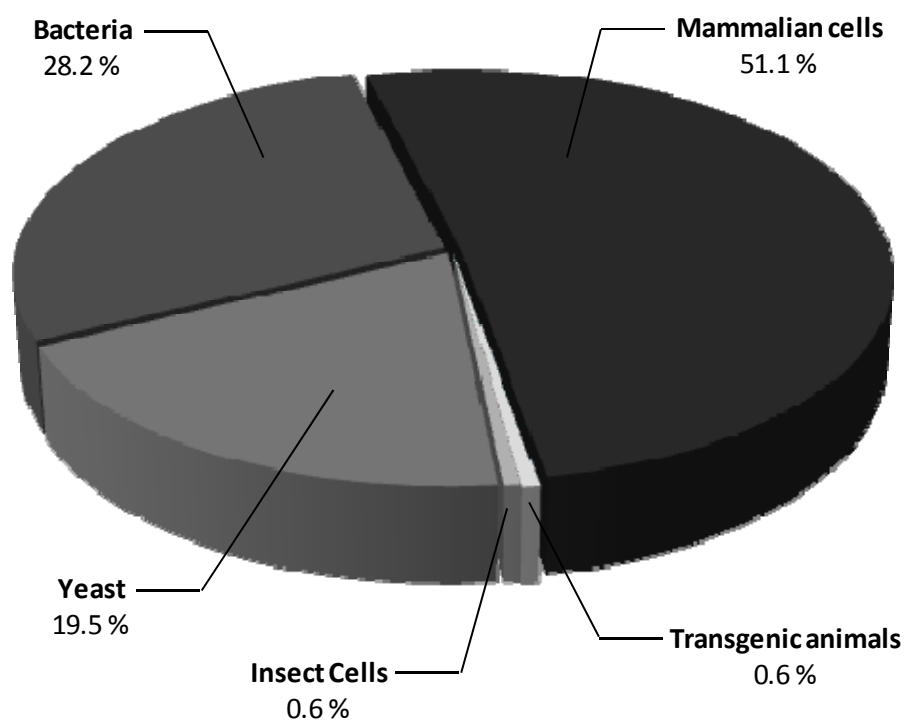
#### **2.2.2.2.1 Bacterial platforms**

##### *Actual market share*

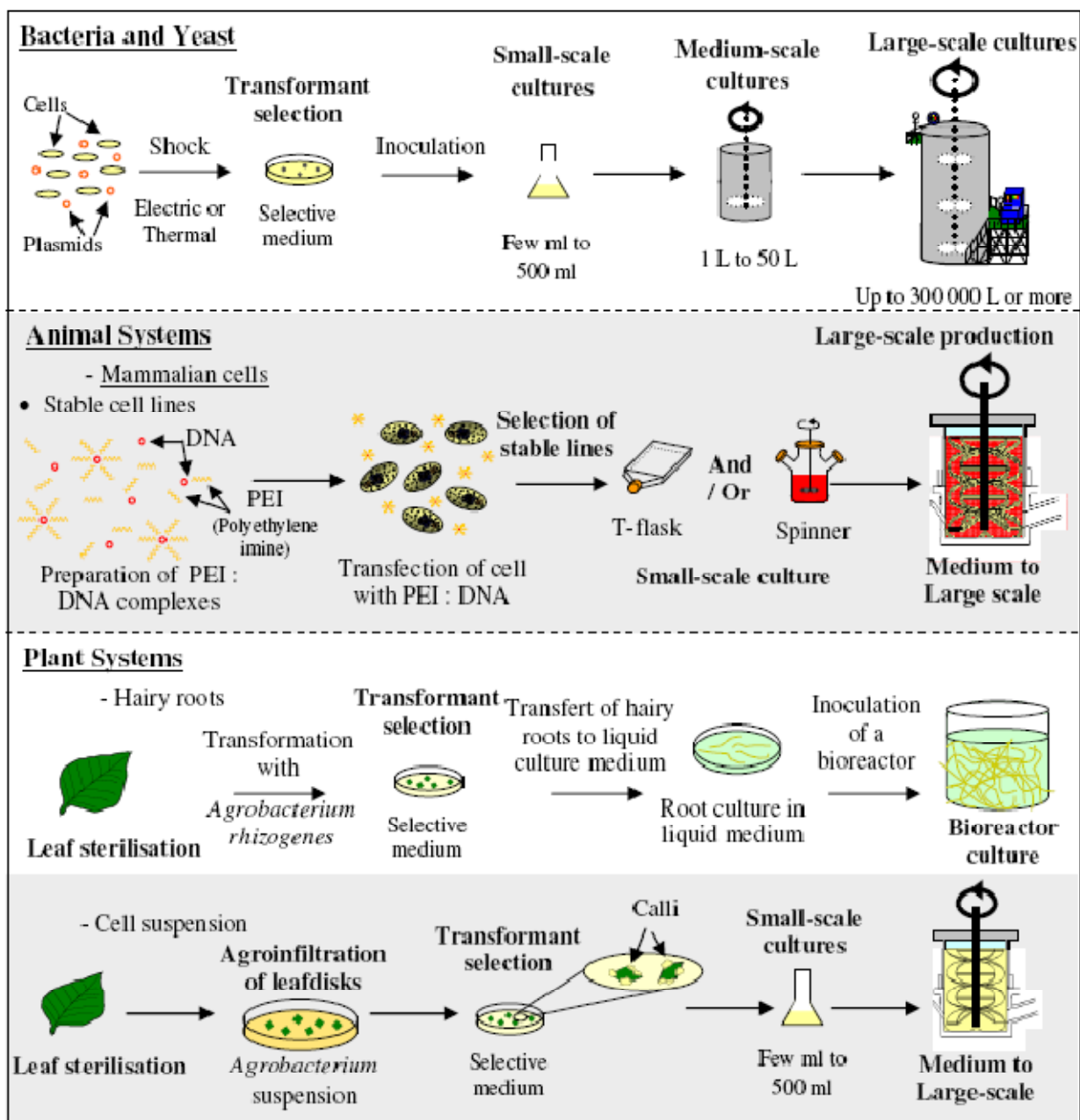
The first commercialized recombinant proteins were produced using an *E. coli*-based platform. They were human insulin in 1982 (Humulin®, Eli Lilly Inc.), human growth hormone somatropin (Protropin®, Genentech Inc.) in 1985 and interferons  $\alpha$  2a and 2b (Roferon®, Hoffman-La Roche, Intron A®, Schering-Plough) in 1986 (see Table S1 in Annexe 1 for a complete list). Nowadays, to the best of our knowledge, there are 49 products actually on the market that are produced by *E. coli* (Table 2.1). This represents 28.2 % of total bioproducts on the market (Figure 2.1).

##### *Production and bioprocess development*

To develop an industrial bioprocess from the start, *E. coli* cells must be first transformed using either a thermal or an electric shock to incorporate the plasmid bearing the gene of interest (Yoshida and Sato, 2009) (Figure 2.2). Transformants will generally be selected using an antibiotic resistance gene, transferred together with the gene of interest within the same plasmid, and cultivated at small scale (mL level in Petri dish or test tube) before inoculating a large-scale bioreactor cascade. Large-scale production cultures can reach high cell density of 20 to 175 g/L cell dry weight (Lee, 1996) and involve low cost media compared to those used in animal cell cultures (Westers et al., 2004). Both Batch and Fed-Batch are the most common industrial



**Figure 2.1** Recombinant protein products on the market per production platform



**Figure 2.2** Description of the development and scale-up steps for the major *in vitro* platforms

processes used (Chou, 2007). One of the drawbacks with *E. coli* high-density culture is acetate formation which negatively affects growth and protein production. However, control of dissolved oxygen level combined with an exponential glucose feeding strategy can minimize acetate formation (Eiteman and Altman, 2006).

### *Posttranslational modifications*

*E. coli*'s ability to produce large quantities of a great variety of proteins has been demonstrated (Graumann and Premstaller, 2006). *E. coli* can accumulate recombinant proteins up to 80 % of its dry weight (Demain and Vaishnav, 2009). However, formation of stable intra- or intermolecular disulfides bonds is not possible in the cytoplasm of *E. coli* due to their rapid reduction by the combined action of thioredoxins and glutaredoxins (Ritz and Beckwith, 2001). When heterologous proteins fail to rapidly reach their native conformation, they either aggregate to form inclusion bodies or are degraded (Baneyx and Mujacic, 2004). Furthermore, proteins larger than 60 kD are inefficiently obtained in soluble forms in *E. coli* (Gräslund et al., 2008). Misfolding is even greater when concentrations of recombinant proteins are high (Baneyx and Mujacic, 2004). Inclusion bodies are not pure aggregates of recombinant proteins and they usually contain 15-20 % of contaminants, mainly outer membrane proteins, ribosomal components and few amounts of phospholipids and nucleic acids that probably absorb when cells are lysed (Valax and Georgiou, 1993). To obtain proteins with native structure, inclusion bodies must first be extracted, solubilized by denaturants to unfold proteins, and disulfides bonds must be eliminated with reducing agents. Proteins are then correctly refolded using air oxidation, glutathione reoxidation system and mixed disulfides of protein-S-sulfonate and protein-S-gluthatione systems (Demain and Vaishnav, 2009).

### *Secretion capacity*

Targeting proteins to the periplasmic space or to the culture medium could facilitate downstream processing, folding, and *in vivo* stability, enabling the production of soluble and biologically active proteins at a reduced process cost (Mergulhao et al., 2004). Since *E. coli* does not naturally secrete high amounts of proteins (Sandkvist and Bagdasarian, 1996), it could facilitate downstream processing. Periplasm has several advantages for expressing eukaryotic proteins because of its oxidative environment suitable for disulfide bond formation (Chou, 2007). It also contains fewer proteases than the cytoplasm (Baneyx and Mujacic, 2004) and enzymes such as disulfide-binding proteins and peptidyl-propyl isomerases that promote the appropriate folding of thiol-containing proteins (Shokri et al., 2003). Among the five different types of secretion pathways of *E. coli* (I to V), type I and II are the most commonly used to direct protein into the periplasmic space (Mergulhao et al., 2005). In Gram negative bacteria like *E. coli*, secreted proteins have to cross the two membranes of the cell envelope, which differ in both composition and function (Koebnik et al., 2000). Size is a factor that influences protein secretion efficiency; large proteins may be physically unable to translocate (Baneyx, 1999b). In order to improve leaking, different strategies to increase the permeability of the outer membrane have been tested such as mechanical (ultrasound), chemical (addition of magnesium, calcium, EDTA, glycine and Triton X-100) and enzymatic (lysozyme) treatments (Choi and Lee, 2004). However, recombinant proteins are mostly produced as inclusion bodies since *E. coli* is not able to efficiently secrete proteins (Mergulhao et al., 2005; Schmidt, 2004).

### *New trends*

To date, *E. coli* and members of the *Bacillus* family are the most frequently used prokaryotes for industrial production of recombinant proteins (Westers et al., 2004). While *E. coli* is known to produce endotoxins that present a risk for human health (Kusnadi et al., 1997), *Bacillus*, like *B. subtilis* and *licheniformis* are Generally Recognized As Safe (GRAS) because they do not produce these harmful exo- or endotoxins (Westers et al., 2004). However, *B. subtilis* is mainly used for the production of homologous proteins such as proteases and amylases that are used as detergents or in baking industry that represents 60 % of the industrial enzymes of the market (Westers et al., 2004). One of the main problems with *Bacillus* is that they produce many proteases, which reduce the yields of recombinant proteins. In order to overcome this limitation, protease-deficient strains of *B. subtilis* have been developed (Murashima et al., 2002).

In conclusion, production platforms based on prokaryotes are useful for the production of proteins that are not naturally glycosylated (e.g. insulin, hirudins or somatotropins) or those that are normally glycosylated but that are pharmacologically active without glycans (e.g. cytokines, Tumor Necrosis Factor, interleukine or interferons) (Schmidt, 2004). Non-glycosylated produced proteins can also be further glycosylated by additional steps following protein purification, but it is often complicated and expensive.



## 2.2.2.2 Fungal platforms

### 2.2.2.2.1 Yeasts

#### *Actual market share*

Almost one fifth of all the products on the market are produced in *S. cerevisiae* (Table 2.1). Many of these products are related to the control of diabetes (Novolin®, Glucagen®, Actrapid®, Levemir®, Novo Nordisk Inc.), or vaccines against Hepatitis B (Recombivax HB®, Twinrix®, Ambirix®, Fendrix®, GSK Biologicals) or against human papillomavirus (Gardasil®, Silgard®, Merck).

#### *Production and bioprocess development*

Yeasts represent a valuable alternative platform to bacteria, as yeasts possess similar culture needs (Kusnadi et al., 1997) while being able to perform posttranslational modifications (Lin Cereghino et al., 2002). In term of biosafety, yeasts are neither pyrogenic nor pathogenic (Schmidt, 2004). Similar to bacteria, yeasts can be transformed by thermal or electric shock and allow for a rapid turnaround from gene to protein (typically 4-6 months). An additional advantage of these eukaryotic organisms over bacteria is the possibility to integrate the transgene of interest into the yeast genome by homologous recombination, hence increasing expressing cell line stability (Orr-Weaver et al., 1981). Yeast can lead to high recombinant protein titers (> 1g/L) in bioreactor after few days, and bioprocesses have been scaled-up to 100 m<sup>3</sup> (Gerngross, 2004), reaching high cell density of up to 130 g/L of dry cell weight (Schmidt, 2004).

### *Posttranslational modifications*

Yeasts are able to perform many post-translational modifications like O-linked glycosylation, phosphorylation, acetylation and acylation, but they present salient differences with mammalian cells for the N-linked glycosylation (Ferrer-Miralles et al., 2009). N-glycosylation of *S. cerevisiae* is of high-mannose type containing up to 100 or more mannose sugars (hypermannosylation) (Gemmil and Trimble, 1999). This non-human nature of glycans negatively impacts the half-life of the recombinant protein because of the affinity of these glycans for high-mannose receptors found on macrophages and endothelial cells. This often leads to a rapid clearing from the patient system (Mistry et al., 1996). It has also been demonstrated that this high mannose content could negatively impact protein bioactivity. For example, in the case of antibody production, hyperglycosylation was shown to affect Fc domain dimerization due to steric hindrance (Bretthauer and Castellino, 1999). In *S. cerevisiae*, the O-linked glycosylation may be problematic since it contains only mannose compared to mammalian O-glycosylation that is sialyated (Demain and Vaishnav, 2009). Furthermore, recombinant proteins containing many disulfides bonds are often expressed at a lower yield in yeast (Porro et al., 2005)

### *Secretion capacity*

Contrary to bacteria, yeasts can secrete heterologous proteins when linked to a signal peptide (Achstetter et al., 1992). This salient feature is an advantage since although cytoplasmic expression often leads to high expression levels, cell disruption is then required for product purification, which further complicate downstream processing (DSP) due to the release of many intracellular proteins. Also, since yeast cell walls are known to be very robust, high shear must be applied for cell lysis (Porro et al., 2005).

### *New trends*

Alternative yeast species to *S. cerevisiae* are currently studied. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is gaining in interest with the expression of recombinant protein under the control of a methanol-inducible promoter (Ecamilla-Trevino et al., 2000). This strain presents several advantages. Only a few gene copies are sufficient in *P. pastoris* to attain the same yield level as with 50 gene-copies in *S. cerevisiae* (Schmidt, 2004). Compared to *S. cerevisiae*, *P. pastoris* can grow in medium in which methanol is the unique carbon source, thus limiting culture contamination (Gellison et al., 1992). Interestingly, hyperglycosylation is limited in *P. pastoris* to 20 residues of N-linked high-mannose chains as opposed to 50-150 residue chains in *S. cerevisiae* (Dale et al., 1999). *P. pastoris* also lacks  $\alpha$ -1,3-linked mannosyl transferase that is responsible for the terminal linkages in *S. cerevisiae* that causes highly antigenic responses. *P. pastoris* was even successfully modified to secrete proteins with a human type N-glycosylation pattern (Choi et al., 2003). While the specific productivity of mammalian cells for antibodies is significantly higher than that of fungal systems, these can compete by a high concentration of producing cells. The mammalian cell platform can achieve a volumetric productivity of approximately 1-3 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> while a yeast system like *P. pastoris* can reach 5-10 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Gasser and Mattanovich, 2007). *P. pastoris* seems promising but some proteins expressed in this system showed an absence of O-mannosylation (Mochizuki et al., 2001). It is also unable to produce chaperonins to help recombinant protein proper folding (Demain and Vaishnav, 2009). *Hansenula polymorpha*, another methylotrophic yeast, is also being studied because it is known to produce secreted proteins with molecular mass of up to 150 kDa with a high efficiency (proteins larger than 30 kDa are retained in the cytoplasm of *S. cerevisiae*) (Schmidt, 2004).

However, very little amount of literature is available on this yeast specie to date, to the best of our knowledge.

In conclusion, the yeast platform has many advantages over the bacterial platform but is still inadequate when glycosylation profile is a critical issue (Schmidt, 2004).

#### **2.2.2.2.2 Filamentous fungi**

##### *Actual market share*

To the best of our knowledge, no recombinant protein has so far been commercialized using a filamentous fungal platform even though filamentous fungi have been used industrially for decades to produce various endogenous metabolites (Schmidt, 2004).

##### *Production and bioprocess development*

Filamentous fungi are theoretically attractive hosts because of their ability to naturally secrete large amounts of proteins, perform post-translational modifications (glycosylation and disulfidation), and grow on low-cost media (Wang et al., 2005). In suspension, fungi have different morphologies ranging from free filaments (dispersed hyphae) to clumps and pellets (Wang et al., 2005). Many factors influence the appearance of the suspension, like inoculum level, initial pH, agitation, medium composition and use of polymer additives or surface-active agents (Metz and Kossen, 1997). Similarly to bacteria or yeasts, they can achieve high cell density of up to 100 g/L of dry cell content (Maras et al., 1999). Among filamentous fungi, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae* have been classified as GRAS

and are extensively used in the food industry. Strain selection allowed for the development of very productive lines for specific homologous protein production (20 g/L glucoamylase by *A. niger*; 40 g/L cellobiohydrolase I by *T. reesei*) (Maras et al., 1999). For the production of heterologous proteins, stably transformed cell lines can be established by transforming filamentous fungi with plasmid bearing foreign genes which can be incorporated into the fungal chromosome (Demain and Vaishnav, 2009). Electroporation is the state-of-the-art method for transforming filamentous fungi, but protoplast transformation with polyethylene glycol is also commonly reported (Ruiz-Diez, 2002)

#### *Posttranslational modifications*

Filamentous fungi are more complex organisms than yeasts and, consequently, have a more complete posttranslational modifications apparatus, more similar to that of mammals (Schmidt, 2004). Product hyperglycosylation has been observed, but with a less frequent occurrence than in yeast. It has been suggested that hyperglycosylation could be reduced by modulating culture conditions (Maras et al., 1999). *Trichoderma reesei* has even been shown to glycosylate its proteins similarly to mammalian cells (Salovouri et al., 1987).

#### *Secretion capacity*

Even though filamentous fungi can secrete large amount of homologous proteins, yields related to heterologous proteins were demonstrated to be significantly less, with only few milligrams per litre (Maras et al., 1999; Schmidt, 2004). Heterologous proteins are more prone to proteolysis than homologous ones and proteolytic degradation by fungal proteases is acknowledged as one of

the major problems interfering with efficient heterologous protein production in fungal culture (Wang et al., 2005). One reason for this might be the presence of many different proteases as reported for *Aspergillus nidulans* (about 80 different proteases) (Machida, 2002).

### *New trends*

Different approaches are presently being developed in order to increase yields of secreted recombinant proteins by filamentous fungi platforms. A commonly-applied strategy relies on the introduction of multiple copies of the gene of interest that is expressed under a strong homologous gene promoter into a high-protein-secreting mutant strain (Nevalainen et al., 2005). The gene of interest may also be targeted to a particular gene locus such as the one of a major secreted endogenous protein. This “gene replacement” strategy will ensure that the gene of interest will be strongly expressed while reducing the burden on the secretion pathway due to the absence of the endogenous protein (Karhunen et al., 1993). A third strategy is to fuse the gene of interest to the 3’ end of a highly expressed gene such as the one coding for the glycoamylase from *A. niger* or *A. awamori* (Gouka et al., 1997)

In conclusion, filamentous fungi can not be presently regarded as a serious alternative for the production of pharmaceuticals since the yield of various human proteins was reported to be below 1 mg/L (Schmidt, 2004). Nonetheless, research on these species may eventually lead to a rise in their productivity, giving them a place in the recombinant protein market. For more information on this particular platform, the reader is referred to a recent review on antibody production by filamentous fungi (Gasser and Mattanovich, 2007).

### 2.2.2.2.3 Animal platforms

*In vitro* animal platforms mainly include insect and mammalian cells cultures. However, even if the use of transgenic animals is not an *in vitro* production system, it worths being described rapidly as there is now one recombinant protein produced in transgenic animals that is on the market. ATryn®, an Anti-thrombin III use against emboli and thromboses in patients with hereditary antithrombin, is produced in the milk of transgenic goats by GTC Biotherapeutics and was approved by the European Medicines Agency (EMA) in 2006, and by the FDA in 2009 (Table S1). In the past few years, many other products have been developed by GTC Biotherapeutics, Avigenics, Nexia and Progenics; those are presently in preclinical phase of development. To get a detailed list of theses products, the reader is invited to consult an exhaustive review on the topic by Redwan and colleagues (Redwan, 2009). Milk (Soler et al., 2006), chicken egg white (Zhu et al., 2005), blood (Swanson et al., 1992), urine (Kim et al., 2006) and seminal plasma (Dyck et al., 1999) have all been studied as harvest systems, allowing a continuous production without sacrificing the animal (Houdebine, 2002). In term of glycosylation, small differences in protein glycosylation pattern between human and animal exist. However, the main disadvantages of this platform resides in the lag time required to assess production levels in animals (Chew, 1993) and the fact that animals must also be maintained under GAP (Good Agricultural Practices) environment for their entire life, including their initial non-producing time period, hence raising production costs. Furthermore, in the purification process, it may prov difficult to separate recombinant proteins from their host equivalent. Also, they could be deleterious for transgenic animals (Houdebine, 2009), which would limit the use of this production system to inactive or non-interfering proteins (Massoud et al., 1996). The potential for the purified products to contain prions is also a concern for human safety and their

presence would require the destruction of the livestock herds that take years to put in place (Larrick and Thomas, 2001). Finally, production in transgenic animals is also negatively perceived by the population (Houdebine, 2002).

#### **2.2.2.2.3.1. Insect cells**

##### *Actual market share*

The first attempt to produce a human recombinant protein with insect cells was reported in 1983. In that study, an expression vector based on a *Baculoviridae* virus (*Autographa californica*) was used to infect cells derived from *Spodoptera frugiperda*, its natural host, to produce human  $\beta$  interferon (Smith et al., 1983). Nowadays, expression vectors issued from this nuclear polyhedrosis virus remain the most widely used vectors (Kost et al., 2005). However, use of the insect cell platform is still marginal. Only one recombinant protein, Cervarix® (commercialized by GlaxoSmithKline and approved by the EMEA in 2007 (Table 2.1)) is produced using this platform (“High-Five” cell line derived from *Trichoplusia ni*). This represents 0.6 % of the pharmaceutical product global market.

##### *Production and bioprocess development*

Insect cells were initially cultivated in medium supplemented with 5 % or 10 % serum (usually FBS) (Tomiya et al., 2003). Now, insect cells can be grown on various serum- and even protein-free media (Schlaeger, 1996). However, biosafety risks remain since pathogenic arboviruses responsible for yellow or Dengue fevers are able to replicate in insect cells (Stacey and Possee, 1996). Process-wise, large scale production of insect cells is challenging with a higher oxygen demand and higher shear sensitivity than for mammalian cells (Chalmers, 1996). The addition of



tensio-active agents like Pluronic F-68 was shown to protect cells from shear (Agathos, 1996). Insect cell lines have been selected for either suspension and adherent cultures (i.e. High-Five cell line) (Chung et al., 1993), and larval culture has also been developed (Kulakosky et al., 1998).

### *Posttranslational modifications*

Being animal cells, this platform can lead to the proper folding of recombinant proteins with S-S bonds, *N*- and *O*-glycosylation and correct signal peptide cleavage. However, even if insect cell biology allows for the production of complex proteins, the resulting glycosylation profile may be problematic since the expressed proteins mostly contain truncated paucimannosidic *N*-glycans (Maras et al., 1999). These paucimannosidic structures were observed in insect cells from *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Bombyx mori*, *Trichoplusia ni* and *Estigmena acrea* (Tomiya et al., 2003). The inability to produce authentic mammalian glycans has been one of the most significant limitation of the baculovirus-insect expression platform (Jarvis, 2003). Insect cells are unable to synthesize sialyated complex-type *N*-glycans and they even add potentially allergenic structures such as  $\text{Fuca}(1,3)\text{GlcNAc-Asn}$  that are not present on mammalian glycoproteins (Tomiya et al., 2003). Since unsialyated glycoproteins can be rapidly cleared from human sera (Sinclair and Elliott, 2005), many research groups have looked to humanize the *N*-glycans profile in insect cells. Interestingly, production of a sialyated recombinant protein in *Trichoplusia ni*, cultured in the presence of *N*-acetylmannosamine, a sialic acid precursor, has been reported (Joshi et al., 2001).

### *Secretion capacity*

Secretion of recombinant proteins in insect cells is possible but, since the infection process is lethal (Ferrer-Miralles et al., 2009), the cells are generally liquefied, which makes them liberate all their cellular content. Baculoviruses express proteases as a part of their strategy for wide horizontal transmission *in vivo* at an advance stage of viral infection (Tomiya et al., 2003), a phenomenon involving a series of events resulting in impairing protein folding (McCarroll and King, 1997). The use of protease inhibitors usually allows to overcome this high proteolytic activity (Ikonomou et al., 2003).

### *New trends*

Recombinant protein biosynthesis is generally maximal near death of infected cells; however, it is possible that the overall processing of the protein is suboptimal at that time (Altmann et al., 1999). One strategy being developed is the use of early baculoviruses promoters in either transiently (Bernard et al., 1994) or stably transformed cells (McCarroll and King, 1997).

In conclusion, there are important limitations with the insect cells platform. Cell growth rate is low compared to that of yeasts and bacteria and the cost of medium, even if lower than for mammalian cells (next section), is higher than in the case of microbial platforms (Ferrer-Miralles et al., 2009). Nonetheless, this production platform is widely used for the production of recombinant proteins for research purpose.

### **2.2.2.2.3.2 Mammalian cells**

#### *Actual market share*

Mammalian cells have become the most important platform when considering the number of products on the market, i.e., 96 commercialized products representing over 50 % of the market (Table 2.1) for recombinant proteins (Grillberger et al., 2009). Those range from blood factors (Kogenate FS®, Bayer Corp., Bioclata®, Baxter HealthCare Corp.) and anticoagulants (Recothrom®, Zymogenetics Inc.), to growth hormones (Saizen®, Serostim®, EMD Serono Inc.) and monoclonal antibodies (Simponi®, Centocor Ortho Biotech Inc., Humira®, Abbott) (see Table S1 in Annexe 1 for a detailed list).

#### *Production and bioprocess development*

Mammalian cell lines are usually derived from rodents, such as the widely used Chinese Hamster Ovary (CHO) cells and Baby Hamster Kidney (BHK) cells (Schillberg et al., 2005). Other commonly used cell lines are NS0, a non secreting subclone of the NS-1 murine myeloma cell line, and the human embryonic kidney cells (HEK) (Wurm, 2004). Human cell lines were also recently approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and their use is mainly focused on the production of heavily glycosylated proteins (Ferrer-Miralles et al., 2009). Hybridomas, generated from the fusion of a murine B-cell expressing a specific monoclonal antibody and a myeloma tumor cell that grants immortality to hybridomas, are the platform of choice to produce monoclonal antibodies (mAbs) (Ferrer-Miralles et al., 2009). In order to develop stable cell lines, calcium-phosphate (CaPi) (Jordan and Wurm, 2004) and polycations such as polyethylenimine (PEI) (Boussif et al., 1995) are currently among the most cost-effective and efficient transfection vehicles used in large-scale operations (Pham et al., 2006). Mammalian

cell cultivation is, however, expensive when compared to the prokaryote platforms due to the culture media cost. This comes from the high cost of specific biomolecules that are required to replace serum originally present in cell culture media (Wurm, 2004). Currently, most of mammalian cell lines are now adapted to grow in suspension in serum- and protein-free chemically defined media (Ferrer-Miralles et al., 2009), raising the cost of culture media from 5-20 \$ to more than 100 \$ per litre. This cost increase is mainly caused by the addition of various growth factors, co-factors and precursors (Grillberger et al., 2009). Serum removal from cell culture media is, however, preferred in the industry as it abrogates the risks of virus and prion contamination (Grillberger et al., 2009; Wurm, 2004). Since the mid-80's, yields in recombinant protein have been improved more than 100-fold, due to improvements in media composition and of process operation strategies (Wurm, 2004). For example, maximal cell density increased from  $2 \times 10^6$  cells/ml to more than  $10 \times 10^6$  cells/ml, and the product titers increased from 50 mg/L to up to 5 g per litre, in 3 weeks (Wurm, 2004). Furthermore, the Wyeth company has recently claimed to achieve levels of recombinant proteins of 9 g/L (Ledford, 2006).

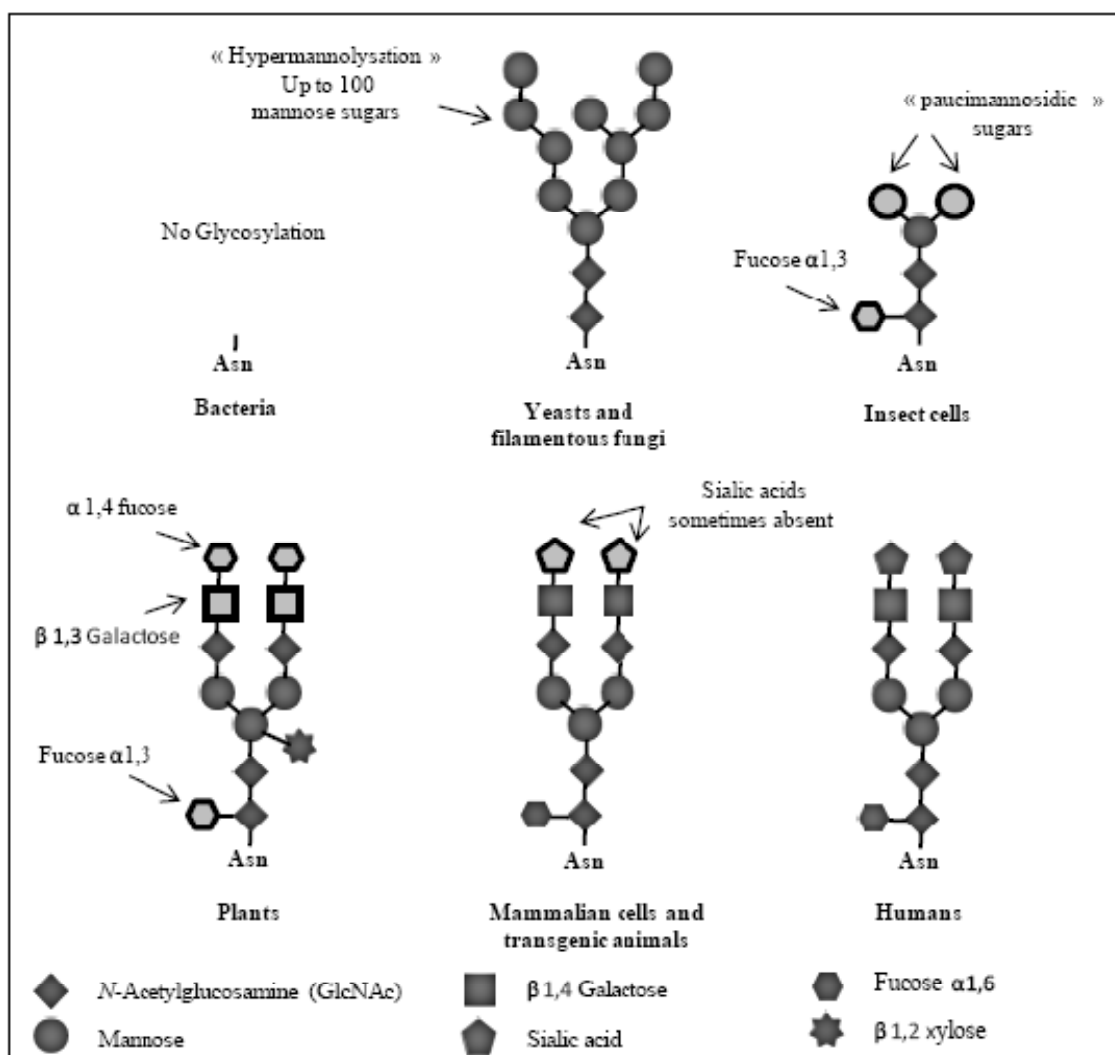
### *Posttranslational modifications*

The major advantage of this platform relies in its capacity to lead to adequately folded and glycosylated recombinant proteins of human origin (Jenkins et al., 2009). Animals and animal cells have the advantage to produce proteins that are almost identical to human proteins (Schillberg et al., 2005). Only marginal differences between human and non-human mammalian glycosylation patterns were observed (Grabenhorst et al., 1999). The most important difference corresponds to the absence of a sialic acid normally found in human glycosylated proteins (Dingermann, 2008) (see Box 1). However, protein glycosylation may be unstable and unreliable

**Box 1. A Note on Glycosylation.**

Glycosylation is a highly complex post-translational modification process taking place in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. It involves more than a hundred different proteins (Dingermann, 2008). Almost all secreted eukaryotic polypeptides are glycosylated. Glycosylation is species-, tissue- and cell-type-specific (Parekh, 1989). Many human proteins require the addition of the sugars to prevent them from being misfolded, biologically inactive, cleared from the circulation too fast, or lead to unwanted immunological response (Coloma et al., 2000). Glycans also affect thermal and pH stability of proteins and in their absence some sites are rendered unhindered for proteases degradation (Maras et al., 1999). In few cases, glycosylation is essential to ensure a proper cellular targeting, like in the case of the glucocerebrosidase that needs to be delivered to macrophages and subsequently incorporated in lysosomes to treat patients with Gaucher disease (Friedman et al., 1999).

There are two types of glycosylation: *N*- glycosylation and *O*- glycosylation. While *N*-glycans are linked to asparagines residues of the glycoprotein in the sequence Asn-X-Ser/Thr, *O*-glycans are linked to the O of the serine and threonine residues. Human *N*-glycosylation is complex since it contains a tri-mannose core extended with GlcNAc, galactose and sialic acid (Gerngross, 2004).



(Box 1. continued)

in mammalian cells (Houdebine, 2009). For example, heterogeneity in glycosylation patterns was reported in mAbs produced by hybridoma, which was demonstrated to affect mAb structural integrity, and in turn influence both their biological function and their physicochemical properties (Serrato et al., 2007).

### *Secretion capacity*

Mammalian cells generally secrete recombinant proteins and secretion has been shown to be further enhanced through metabolic engineering in order to facilitate downstream processing (Wurm, 2004).

### *New trends*

Due to media cost and long doubling time (16-48 hours) (Chuck et al., 2009) as compared to bacteria (< 1h for *E. coli*) or yeast (~2.5 h for *S. cerevisiae*), the establishment of a stable expressing mammalian cell line can be laborious, expensive and time-consuming (Liu et al., 2008). Many efforts are thus being put into the development of performant transient expression systems. Transient transfection of mammalian cells grown in suspension culture has gained in interest because of its ability to produce tens to hundreds of mg of recombinant proteins per litre in a week timescale (Durocher et al., 2002; Geisse and Henke, 2006). However, some serum-free suspension culture media showed to be incompatible with transfection reagents and result in a lower transfection efficiency (Geisse and Henke, 2006). In addition, medium exchange may be required prior or after transfection due to the toxicity of transfection reagent (Liu et al., 2008). Although a transient process has the advantage of enabling a rapid passage from biomolecule

screening to market production, its economical advantage at large-scale is still questionable since the technology requires the production of large amounts of transformation vectors in parallel cultures. Finally, as in the case of stable mammalian cell lines, there is a need to develop low-cost and totally defined culture media.

In conclusion, mammalian cells are widely used in industry because of their ability to produce recombinant proteins almost identical to their human counterpart; however, the costs related to these production platforms (stable and transient expression systems) remain high.

#### **2.2.2.2.4 Plant platforms**

As previously mentioned, in the last decades, the industry mainly focused on platforms relying on microbes or mammalian cells. In 2006, the arrival on the market of the first veterinary vaccine produced in a plant system (tobacco cells) has forced some colleagues and the industry to reconsider their evaluation of the potential of the plant production platform. This vaccine against the poultry Newcastle disease virus is produced by DowAgroSciences, one of the many companies that are now developing pharmaceutical and non-pharmaceutical products in plant systems (Mett et al., 2008).

#### *Production and bioprocess development*

Over the last few years, plants have emerged as one of the most promising low-cost platform for the production of recombinant proteins (Shekhawat et al., 2008). Studies now report the production of a variety of proteins in plants, such as antibodies, vaccines, hormones and growth factors (Twyman et al., 2003). Plants can effectively process, correctly fold and assemble



multimeric proteins. Furthermore, they do not promote the development of human infectious agents, a key burden in the approval process of biopharmaceuticals by the regulatory agencies (De Wilde et al., 2000). Plant systems are believed to be competitive compared to the microbial platforms in terms of cost and protein complexity (Twyman et al., 2003). Most stable gene transformation methods involve nuclear transformation such as *Agrobacterium*-mediated transformation (Horsch et al., 1985), and particle bombardment (Klein et al., 1988). The former method is indirect and involves the cloning of foreign genes into binary vectors based on the Ti (tumor-inducing) plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* (Shih and Doran, 2009). The infection of the plant is then mediated by *A. tumefaciens* or *A. rhizogenes*. Dicotyledonous plants are naturally susceptible to an infection by these bacteria. For monocotyledonous plants or plant species that are generally more resistant to *A. tumefaciens*, the transformation efficiency is still unsatisfactory (Rao et al., 2009). In these cases, a biolistic approach where DNA constructs are deposited on microbeads and projected at a high velocity on plant cells can be used. Other plant transformation methods have been developed and the reader is invited to consult a recent and detailed review on this subject (Rao et al., 2009).

Compared to the use of whole plants in fields, *in vitro* production platforms offer the possibility to manipulate and maintain culture parameters, hence providing better consistency in product quality and yields (Hellwig et al., 2004; Shih and Doran, 2009). This approach may thus facilitate approval of production process and therapeutics by regulatory agencies (Tiwari et al., 2009). It is thus not surprising to notice an increasing interest for the development of production processes using bioreactors (Fischer et al., 2004) since *in vitro* culture is independent of seasonal variations and enables continuous supply (Tiwari et al., 2009) with shorter production cycles than those

related to field cultures (Schillberg et al., 2005). Production rates in whole plants may differ from generation to generation, but with hairy roots or plant cell suspensions, master cell banks (MCB) can be generated to ensure repeatable productions, lot after lot (Cho et al., 2007; Schmale et al., 2006a; Teoh et al., 1996). In plant cell suspensions, cell-to-cell communication is minimized, resulting in reduced systemic post-transcriptional gene silencing (PTGS) (Huang and McDonald, 2009). Growth of genetically modified plant cells and tissues in a confined environment such as a bioreactor represents an environmentally acceptable method of production (Tiwari et al., 2009). In addition, a clear advantage of an *in vitro* platform is the possibility of secretion of the recombinant protein into the medium, further simplifying DSP (Doran, 2000), which may represent the main economical burden for such a platform (Shih and Doran, 2009).

#### *Posttranslational modifications*

The glycosylation pattern of human proteins that have been synthesized in plants slightly differed from that of human origin (see Box 1). These differences include 1) the addition of a  $\beta$ 1,2-xylose 2) an  $\alpha$ 1,3-fucose linked to N-acetyl glucosamine (GlcNAc) instead of an  $\alpha$ 1,6fucose, and 3) a  $\beta$ (1,4)-fucose and  $\beta$ (1,3)-galactose instead of  $\beta$ (1,4)-galactose to GlcNAc (Pujol et al., 2007). The most important difference resides however in the absence of terminal sialic acid that affects serum clearance in patients. Linked sugars also contain xylose (usually not seen on human proteins), which may induce deleterious immune response in patients (Houdebine, 2009). However, recent literature suggests that these differences in glycosylation pattern do not affect protein bioactivity. As an example, antibodies produced in plants that harbored glycosylation differences at the antibody Fc glycosylation sites had no major influence on the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) nor on the activation of the complement cascade

(Brodzik et al., 2006; Ko et al., 2005). In conclusion, as for all production platforms, proteins produced in plants have to be assessed for their bioactivity and side effects (Pujol et al., 2007).

An alternative to the use of whole plants for recombinant protein stable or transient expression are the use of *in vitro* culture (Tiwari et al., 2009), hairy roots (Kumar et al., 2006) and cell suspension (Kumar et al., 2005) cultures that are gaining in interest as presented in the following sections.

#### **2.2.2.2.4.1 Hairy roots**

Most studies on recombinant protein production have been performed using dedifferentiated cultures such as calli and cell suspensions rather than differentiated organs such as hairy roots and teratomas shoots (Doran, 2000). Nonetheless, even if, to best of our knowledge, no recombinant protein product from hairy roots is actually commercialized, the production of recombinant proteins with this platform is promising. Among the advantages of hairy roots is the fact that these tissues are characterized by a lack of geotropism, numerous and dense hairs, lateral branching, and genetic stability as well as unlimited growth on hormone-free medium (Guillon et al., 2006). They are generated by genetic modifications of plant leaves or stems by Ri-T DNA transfer, the latter being mediated by *A. rhizogenes* (Tiwari et al., 2009). Hairy roots were initially studied for the production of phytochemicals and various compounds issued of their secondary metabolism (alkaloids, anthocyanins, saponins, terpenes) (Srivastava and Srivastava, 2007). Recent studies, however, revealed the potential of hairy roots for the production of recombinant proteins. Gaume et al. (2003) demonstrated that human secreted alkaline phosphatase (SeAP) could be produced and secreted by tobacco hairy roots in hydroponic culture

(Gaume et al., 2003). Moreover, multimeric proteins such as immunoglobulins and monoclonal antibodies have been produced in their active form by rhizosecretion in transgenic tobacco (Drake et al., 2003; Komarnytsky et al., 2006). Of interest, when recombinant proteins are directed to secretion pathways, their concentrations in medium was higher than in the root tissues (Borisjuk et al., 1999). The total surface being effective for protein secretion is strongly increased by the root growth pattern with branching and root hairs (Guillon et al., 2006). Furthermore, hairy roots can be grown in shake flasks, or in mist or air-lift bioreactors (Liu et al., 2009). It is also important to note that the nature of the hairy root culture, a natural cell/medium separated system, facilitates DSP steps. However, when compared to microbial, mammalian or even plant cell cultures, for which viable cells all undergo cell division cycles, hairy roots are composed of meristematic cells that continuously divide and remaining cells that do not divide (Hjortso, 1997). Consequently, their global growth rate is reduced and their doubling time may take up to few days. For example, it was reported that, depending on subculture frequency, hairy roots from *Catharanthus roseus* are characterized by doubling time of 3.2 to 4 days (Jolicoeur et al., 2003; Rijhwani and Shanks, 1998). In addition to slower growth rates, hairy root cultures are composed of different cell types, which can lead to product variability and heterogeneity, and scale up at industrial volumes ( $>1\text{m}^3$ ) is not trivial (Guillon et al., 2006).

#### **2.2.2.2.4.2 Cells suspension**

##### *Actual market share*

Among all the plant-related platforms, cell suspensions may have the highest potential for large-scale production of recombinant proteins destined to pharmaceutical market (see Table 2.3). Indeed, as previously mentioned, the first veterinary vaccine produced in plant cells (tobacco) was commercialized in 2006 by DowAgroSciences. Moreover, Protalix Biotherapeutics lead

**Table 2.3 Detailed list of recombinant proteins in development in plant cells**

<b>Drug commercial name &amp; molecule name</b>	<b>Company</b>	<b>Platform</b>	<b>Status</b>	<b>Description</b>
<b>UPLYSO<sup>1</sup></b> Glucocerebrosidase	Protalix Biotherapeutics	ProCellEx (carrot cells)	Clinical phase 3 Fast track designation from FDA	Indicated for the treatment of Gaucher disease.
<b>PRX-102</b> Galactosidase	Protalix Biotherapeutics	ProCellEx (carrot Cells)	In development: Animal testing phase	Indicated for the treatment of Fabry disease.
<b>Acetylcholinesterase</b>	Protalix Biotherapeutics	ProCellEx (carrot Cells)	In development: Animal testing phase	Indicated to treat nerve gas and pesticides poisoning
<b>IPLEX</b>	Phyton Biotech / Insmad Inc.	N.A.	In development. Partnership established in 2006.	Indicated for the treatment of growth failure
<b>Poultry vaccine NDV</b>	DowAgroScience	Tobacco plant cells	Approved in 2006	Veterinary vaccine

<sup>1</sup>: UPLYSO was formerly known as prGDC

product, UPLYSO, a glucocerebrosidase for the treatment of Gaucher's disease (formerly known as prGDC), is currently in clinical phase 3 and is now produced in carrot cells cultivated in bioreactor. In this specific case, FDA accelerated product approval because of a shortage in the therapeutic Cerezyme (Genzyme Inc.) caused by a viral contamination of CHO producing cells (Bethencourt, 2009). Using the same platform, Protalix Biotherapeutics is also developing two other products, i.e., a galactosidase and an acetylcholinesterase, that are in animal testing phase. Many plant species have been envisaged and suspension cells from tobacco are among the most studied, but others such as from rice are still in development (Doran, 2000). Compared to whole plants and hairy roots, biomass can be rapidly generated with plant cells. For instance, BY2 tobacco cells double in 12h when cultured in optimal growth conditions (Nagata et al., 1992). As mentioned previously, the glycosylation pattern of recombinant proteins that are expressed in plants differs with leaves age (Elbers et al., 2001). In contrast, glycan patterns were reported to be reproducible from batch to batch in BY2 tobacco cell cultures (Liénard et al., 2007). Plant cells are known to naturally secrete about 100–500 mg/L of total soluble proteins in culture medium (Huang and McDonald, 2009), another advantage for subsequent DSP. However, the yields for recombinant proteins that have been reported remain relatively low. For a secreted product, yields in the range of 1–5 mg per L of medium may be expected (Hellwig et al., 2004) while they represent less than 1% of the total soluble proteins (TSP) when they accumulate in the cells (DeGray et al., 2001; Doran, 2006a). Such low yields are generally considered to be insufficient for the platform to compete with the established ones (Kusnadi et al., 1997). However, this assumption has to be toned down since *in vitro* plant cell culture can reach very high densities as compared to mammalian or microbial platforms. For example, the maximum packed cell volume occupied by mammalian cells in a bioreactor corresponds only to 2-3 % of the whole volume and 30 % for microbial cultures (bacteria and fungi) (Wurm, 2004), while plants cells in suspension

can reach 80-90 % of the packed cell volume (Jolicoeur et al., 1992). The potential of highly producing suspension plant cell cultures has thus the potential to be highly competitive when compared to the other well-established production platforms.

### *New trends*

A transient expression approach offers several advantages including a short timeframe from the gene to the expression of a recombinant protein (Joh and VanderGheynst, 2006). Traditionally, transient expression in plants has been performed by infiltrating an *Agrobacterium* bacterial suspension, using a vacuum or a syringe in plant leaves that are then harvested a few days later for their content in recombinant proteins (Kapila et al., 1996). This method, called agroinfiltration, is now generally used for the rapid production of gram-scale quantities of recombinant proteins. A recent study by Andrews and Curtis suggested that *Agrobacterium*-mediated gene transfer may also serve for transient expression in plant cells (Andrews and Curtis, 2005). In their system, plant cells are cocultivated with *Agrobacterium* for a few days before being harvested. The coculture of bacteria and plant cells can be problematic since *Agrobacterium* has a growth rate 20 times faster than plant cells (Collens et al., 2004). In agroinfiltration, the growth of *Agrobacterium* is naturally limited by a nutrient limited environment (Kapila et al., 1996). Such is not the case in suspension cell cultures. In order to control bacterial growth in the medium, Collens and colleagues (2004) developed an *Agrobacterium* auxotrophic strain whose growth can be limited in culture. When cocultured with tobacco cells, the auxotrophic strain (designated Cys-32) lead to a 85 fold increase in the expression of a recombinant protein (GUS in that case) when compared to unmodified *Agrobacterium* (Collens et al., 2004). When compared to a conventional agroinfiltration of plant

leaves with the prototrophic *Agrobacterium* strain C58, cocultivation of plant cells with the auxotrophic strain Cys-32 achieved similar yields. For both transformation methods, three different tobacco species were tested (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana glutinosa*). The highest yield with the leaf infiltration method was obtained with *N. benthamiana* and reached 0.025 % of the total soluble proteins (TSP) For the coculture, the highest yield was similar with 0.04 % TSP for the *N. glutinosa* species. When converted, these yields are estimated to be between 50 to 75 µg recombinant proteins (GUS) per kg fresh weight. This study thus proved that a transient expression system using plant cells cocultivated with auxotrophic strains of *Agrobacterium* could be a promising alternative to agroinfiltration. In conclusion, transient transformation of plant cells in bioreactors is thus highly promising although the process still requires further optimization to ensure reproducibility and economically competitiveness at large-scale.

### **2.2.3 The challenges of *in vitro* molecular farming**

In the previous sections, it was demonstrated that each production platform has its own niche in terms of quality of recombinant proteins produced, but also in term of production costs. That is, microbial platforms for the production of naturally unglycosylated proteins or proteins that are normally glycosylated but active without glycans; animal and mammalian cell platforms for highly glycosylated proteins for which glycosylation profile is crucial for bioactivity; and emerging plant-based platforms for highly glycosylated proteins for which the glycosylation profile is important but not essential for the bioactivity of the recombinant protein.



Therefore, because of its intrinsic lower costs and high innocuity level, the *in vitro* plant cell platform has a huge potential for the production of proteins for diagnostic and therapeutic use, both for animal and human health (Tiwari et al., 2009). The expression levels of the *in vitro* plant cell platform, however, needs to be increased for economical competitiveness (Chen et al., 2005). Therefore, an overview of the various approaches aiming at addressing this issue is presented in the next section.

### **2.2.3.1 Optimization of the expression cassette**

Optimizing transgene expression cassettes can maximize plant cell specific productivity. Elements like untranslated regions (UTRs), codon sequence and promoters can be modified to either increase transcription or translation steps.

Each of the untranslated regions (UTR) surrounding a coding sequence, either in 5' or in 3', can have a significant impact on the expression level of a gene and/or stability of the mRNA produced. The 5' UTR is very important for translation initiation and plays a critical role in determining translational efficiency (Sharma and Sharma, 2009). For example, it was reported that, due to enhanced translational efficiency of transcripts, transgene expression has been raised several fold using the 5' UTR of alfalfa mosaic virus mRNA 4 or tobacco etch virus (Gallie et al., 1995). The 3' untranslated region also plays an important role in steady state mRNA accumulation as it contains the message for transcript polyadenylation that directly affects mRNA stability (Chan and Yu, 1998). Recently, a high-level expression vector was developed for the production of recombinant proteins in plants based on the cowpea mosaic virus (CPMV) using both 5' UTR and 3' UTR of the virus (Sainsbury and Lomonosoff, 2008).

According to plant species and even genes within a same species, codon usage may be biased (Sharp and Li, 1987). The codon bias is adapted as a function of the abundance of tRNA for a more effective translation of the mRNA. The use of the main tRNA allows faster translation rate and higher fidelity (Gustafsson et al., 2004). Consequently, expressing a mammalian gene in a plant cell system, may affect final yield. Studies performed in plants report an increase in protein expression from 5 to 100 times after codon optimization of a yeast (Hamada et al., 2005) or insect gene (Perlak et al., 1991). In order to determine the optimal codon sequence without experimental tests, algorithms such as GASCO (Sandhu et al., 2008) and QPSO (Cai et al., 2008) can be exploited.

Promoters are elements that control gene transcription. Since optimizing expression cassettes is tedious and time-consuming, a simple solution is to use a strong promoter. Indeed, producing more mRNA would compensate for a poor productivity related to mRNA instability, faintly translated mRNA or even short half-life proteins (Mirksch et al., 2005). Promoters may be classified as either constitutive or inducible.

The promoters that induce the expression of genes, irrespectively of the environment or developmental factors, are called constitutive promoters (Sharma and Sharma, 2009). When a constitutive promoter is used, the production of a recombinant protein is expected to rely on plant cell growth (Corrado and Karali, 2009). Promoters such as CaMV35S (from the cauliflower mosaic virus) (Odell et al., 1985) are widely used. Even if it confers a good expression level in both dicots and monocots, the CaMV35S promoter is more effective in dicots, probably because of differences in specificity or amount of the necessary regulatory factors that can recognize it (Sharma and Sharma, 2009). However, constantly expressing a recombinant protein may interfere

with the host metabolism or impact cell physiology/homeostasis due to potential toxicity effect related to recombinant protein accumulation (Huang and McDonald, 2009).

The use of promoters that can be activated in response to defined stimuli has been studied as a mean to trigger protein expression at a given time. This approach is particularly advantageous with products that are characterized by short half-lives or that are toxic for the cell. In those cases, the use of inducible promoters will result in greater yields in bioactive proteins. In transgenic plants and plant cells, transgene expression can be induced at a specific growth cycle stage of the host cell. This strategy can minimize the risks of developing PTGS (Vaucheret et al., 2001). The portrait of ideal inducible promoters, as recently reviewed by Saidi and colleagues (Saidi et al., 2005) can be summarized by the following characteristics: 1) the promoter must allow for a dose-dependent expression, 2) the inducer must not affect cell viability and physiology and, 3) the inducer must be inexpensive to be used in large-scale production processes. The use of heterologous elements for the control of transgene expression ensures the control of the promoter and thus minimize expression leakage (Corrado and Karali, 2009). Consequently for the plant platforms, several inducible systems have been taken from components of quite diverse origin such as viruses, bacteria, yeast, fungi, insects and mammals. Various approaches have been developed, such as chemically inducible promoters or abiotic stress inducers (e.g. light and temperature).

A wide variety of chemically inducible promoters have been developed for the plant platform. However, a common problem observed with chemical inducers resides in diffusional limitations when tissues or cells that form small aggregates. More specifically, the concentration of the inducer may not be uniformly distributed and global yield can be affected. The use of compounds such as,  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), ethanol, tetracycline, dexamethazone and phytohormones

have been reported but they are often expensive to use at large scale, leaky or toxic. For a detailed review on chemical inducers that have been developed for plant platforms, the reader is invited to consult (Padidam, 2003).

Light is an important effector in plants as it regulates growth and development. Three different sensory pigments, the phytochrome (Siegelman et al., 1966), the cryptochrome (Gressel, 1979) and the U.V.-B photoreceptor (Yatsushashi et al., 1982) are known to control light-induced differentiation processes and each of them captures a specific spectral range (Kaulen et al., 1986). However, the use of light-inducible systems at large scale in the context of *in vitro* plant cells would raise operation costs related to the illumination of the bioreactor. Furthermore, since plant cells may reach high cell densities, light transmission in the bioreactor would also be limited and possibly problematic for induction.

Controlling promoters activity by varying culture temperature may also enable precise "on" and "off" regulation time periods (Yoshida et al., 1995). Heat-shock response was initially discovered in *Drosophila* (Ritossa, 1962) and is now known to be widely conserved in living cells (Yoshida et al., 1995). Recombinant protein production using heat-inducible promoters derived from heat shock proteins is now applied to almost all traditional platforms such as bacteria (Okita et al., 1989), yeast (Fujita et al., 2006), insect cells (Huynh and Zieler, 1999), mammalian cells (Tsao et al., 1992) and plants (Lee et al., 2007; Yoshida et al., 1995). In some cases, promoters from a species may be active in another. For example, the *Drosophila hsp70* promoter could be heat activated in tobacco (Spena et al., 1985). Induction is generally observed with a raise of temperature of 5 to 15 °C from the optimal temperature for cell growth. Exposing cells to high temperatures can clearly affect their viability and productivity in a negative fashion. Moreover,

once the cells are heat-stressed, they produce Heat-Shock-Proteins (HSPs), and while some of these proteins are chaperones that will actually help proper folding of the proteins, many are proteases (Fujita, 1999), a major threat for recombinant protein production (Mirksch et al., 2005).

On the other hand, cold temperature switch has only recently started to be considered as inducer. In contrast with HSP response, the mechanisms involved in the response to subphysiological temperatures are still poorly understood (Sahara et al., 2002). However, a careful analysis of the related literature outlined many potential advantages for low temperature induction. Indeed, mRNA stability is thought to be higher at lower temperatures, allowing for a more sustained translation (Mujacic et al., 1999). The toxicity of recombinant proteins, such as the TolAI- $\beta$ -lactamase, a lactamase fused with the transenvelope protein TolA of *E. coli*, was reduced at lower temperature when expressed in *E. coli* (Mujacic et al., 1999). Protein expression at reduced temperatures has been reported to improve recombinant protein folding (Baneyx, 1999a). This may in turn reduce recombinant protein degradation by proteases due to the fact that potential protease cleavage sites are less exposed when the protein is in its native form (Mujacic et al., 1999). In *E. coli*, it has also been reported that synthesis of certain heat-shock proteases was repressed for 60-80 minutes following a temperature downshift from 37°C to 30°C in the strain B/r and from 37°C to 24°C in the strain K-12 (Taura et al., 1989). Few studies report an increased of heterologous protein production and improved product quality in animal cells cultivated at subphysiological temperatures. For example, CHO cells cultivated at 33°C showed an increase of cell specific productivity of rhGM-CSF of 2.1-fold (Fogolin et al., 2004), while the production of Fab fragments in CHO cells cultivated at 28°C resulted in a 14-fold increase in serum-containing medium and up to a 38-fold increase in serum-free medium (Schatz et al., 2003). Production of

erythropoietin (EPO) in CHO cells cultivated at 33°C also lead to an increase in final yield, but the quality of EPO in regard to isoform pattern, sialic content and *in vivo* biological activity was comparable to or even higher than that produced at 37 °C (Yoon et al., 2003). Some cold-inducible vectors have been developed for *E. coli* (Mujacic et al., 1999) and *B. subtilis* (Le and Schumann, 2007), and others are in development in yeast (Sahara et al., 2002) or mammalian cells (Al-Fageeh et al., 2005). Recently, a cold-inducible system was developed to enhance cold tolerance in tobacco, based on the *cor15a* gene from *A. thaliana* (Khodakovskaya et al., 2006). However, to the best of our knowledge, no available literature reports the use or the development of a cold-inducible system for the expression of recombinant proteins of therapeutic interest in plant cells.

#### **2.2.3.2 Use of viral suppressors**

In the early years of transgenic plant development, a phenomenon known as cosuppression was discovered. Stable transgenic plants affected by cosuppression were slowly losing their ability to produce the added transgene. This mechanism was later renamed Post-Translation Gene Silencing (PTGS). Years of research showed that PTGS is a highly conserved mechanism among most, if not all eukaryotes (Voinnet, 2009). In plants, PTGS acts as an adaptive immune system that is targeted against viruses (Ratcliff et al., 1999). Three main biochemical processes are involved in this RNA silencing process: 1) double-stranded RNA (dsRNA) needs to be formed, 2) it is cut into small RNA (sRNA) and finally 3) the sRNA interfere with partially or completely complementary RNA or DNA (Brodersen and Voinnet, 2006). Many plant viruses have evolved mechanisms that suppress RNA silencing (Roth et al., 2004), suggesting a coevolution of the two species (Vance and Vaucheret, 2001). *Agrobacterium*-mediated transient gene expression is normally limited by PTGS. However, this limitation can be overcome by concomitant co-

expression of virus-encoded suppressor proteins (Voinnet et al., 2003). Table 2.4 provides a list of the main viral suppressors used in order to increase protein production and/or prevent silencing. Among them, p19 was co-expressed with recombinant proteins and it was shown to dramatically enhance expression of a broad range of these proteins, allowing up to 50-fold increase in yield (Voinnet et al., 1999; Voinnet et al., 2003).

Heterogeneity of the viral suppressors suggests that their *modus operandi* might be quite diverse. The different molecular mechanisms of the viral suppressors are not yet all discovered. The suppressors may target different steps in the silencing pathway (Vance and Vaucheret, 2001). Some studies also suggest that p19 and p21 would most likely bind to siRNA, hence preventing its interaction with viral RNA (Baulcombe and Molnar, 2004) or, in the case of transgenic plants, with the RNA produced from the transgene. RNA silencing can be triggered locally and spread systemically via a mobile silencing signal (Vance and Vaucheret, 2001). Other proteins, like p25, could interfere with the production or the movement of this silencing signal (Voinnet et al., 2000). The maximum effect of the viral suppressors is not immediate since they need to be produced to a certain level before acting. In other words, it can be said that there is always gene silencing until there is enough viral suppressors to prevent it (Wydro et al., 2006). The use of viral suppressors is nowadays widely used to increase recombinant protein production in plants.

### **2.2.3.3 Bioprocess optimization**

Most of the works on molecular biology aspects that were presented in the previous section can be directly applied to the optimization of *in vitro* bioprocess. However, the maximization of the specific protein expression per cell, as well as the production cost per gram of protein, parameters

**Table 2.4 Main viral suppressors used in research to increase protein production**

<b>Viral suppressor</b>	<b>Origin</b>	<b>References</b>
<b>p19</b>	<b>TBSV</b> (Tomato bushy stunt virus)	(Kim et al., 2007) (Lakatos et al., 2004) (Voinnet et al., 2003)
<b>p21</b>	<b>BYV</b> (Beet Yellow Virus)	(Reed et al., 2003) (Chiba et al., 2006)
<b>p25</b>	<b>PVX</b> (Potato virus X)	(Voinnet et al., 2003)
<b>Hc-Pro</b>	<b>TuMV</b> (Turnip Mosaic virus)	(Wydro et al., 2006)
	<b>PVY</b> (Potato virus Y)	(Wydro et al., 2006)
	<b>TEV</b> (Tobacco etch virus)	(Kim et al., 2007)



that define a platform competitiveness also rely on optimized bioreactor culture conditions. In the following section, focus was put on the key parameters to be considered while developing an *in vitro* molecular farming platform and the reader is invited to consult (Doran, 2000; Doran, 2006a; Jolicoeur, 2006) for detailed information.

When scaling up a process, from shake flasks to bioreactors, the primary factors to be considered are the cell oxygen demand and shear sensitivity, and rheological properties of the cell suspension along the culture duration (Huang et al., 2002). Once the criteria on oxygen transfer and mixing of the cell suspension are met, a strategy can be developed for an optimal management of culture medium composition in order to maximize either cell specific growth rate and/or cell productivity (Cloutier et al., 2009; Huang et al., 2002). Nutritional (Cloutier et al., 2008; and references therein) and kinetic metabolic models (Cloutier et al., 2008; Cloutier et al., 2009; and references therein) are now available for developing efficient culture medium composition and management along a bioreactor culture. pH control can also be needed especially for maintaining the bioactivity of secreted recombinant proteins (Hsiao et al., 1999).

Plant cells have a typical oxygen uptake rate (OUR) of 5-10 mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (0.2 mmol O<sub>2</sub> gDW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) compared to 10-90 mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (12 mmol O<sub>2</sub> gDW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) for microbial cells (Lamboursain et al., 2002) and 0.05-10 mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (0.02-0.1 x 10<sup>-9</sup> mmol O<sub>2</sub> cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) for mammalian cells, depending on cell line (Huang and McDonald, 2009). Plant cell suspensions exhibit a similar to lower OUR than the microbial platforms, but because they usually achieve very high cell density when occupying almost all the culture volume, such cultures become highly viscous with a non Newtonian shear-thinning behaviour (Jolicoeur et al., 1992), a phenomenon which dramatically affect the mixing of the suspension and thus the O<sub>2</sub> mass transfer (Doran, 1999). Because of these problems of cell sensitivity to shear and the build-up of

suspension viscosity, selection of a bioreactor configuration is a crucial step when designing an industrial production process.

### **2.2.3.3.1 Bioreactor configurations**

Gas-lift, mechanically agitated and wave bioreactors have all been studied to culture plants cell suspensions. Most of the bioreactors were designed to perform batches, with protein harvest at the end of the culture, but some were specially configured to allow continuous harvest of the protein of interest during culturing.

#### *Gas-lift bioreactors*

In gas-lift type bioreactors, gas sparging ensures the mixing as well as the oxygenation and CO<sub>2</sub> stripping of the cell suspension. Even if plant cells are bigger than mammalian cells and that they generally grow in aggregates, they are less subject to the shear stress from bursting bubbles (Doran, 1999). However, a significant amount of cells can be entrained with the foam, kept separated from the productive zone, die by necrosis and liberate toxic compounds affecting the active cell suspension. This phenomenon is unfortunately amplified in gas-lift type bioreactors and anti-foam agents such as mineral or silicone oil, polypropylene glycol and Pluronic PE 6100 can be used (Fowler, 1982; Li et al., 1995; Wongsamuth and Doran, 1994). However, these tensio-active agents can negatively impact DSP steps (Prins and van't Riet, 1987) and may reduce plant cell growth (Fowler, 1982; Li et al., 1995). At low cell density, the mixing capacity and the oxygen transfer of most bioreactor configurations allow plant cell growth. However at high cell density, the high viscosity of the suspension (20-30 g DW L<sup>-1</sup> (Doran, 1993) favors coalescence of the gas bubbles, which affects the mixing and thus the oxygen transfer capacity of gas-lift

bioreactors (Jolicoeur et al., 1992). Enriching the gas feed in oxygen can increase the capacity to maintain the dissolved oxygen concentration below non-limiting levels but it can not fully avoid O<sub>2</sub>-limited zones.

Plant cells have the tendency to form aggregates, largely due to the failure of cells to separate after division (Taticek et al., 1991). These aggregates of up to 100 cells (Tanaka, 1982) may be of few millimeters and can sediment, leading to nutrient and O<sub>2</sub>-deprived zones. Raising the gas flow in a bioreactor can reduce cell aggregate sedimentation but it can also favor foam formation, which will induce other problems as previously described (cell entrainment over the culture medium, cell lysis, etc.). In conclusion, gas-lift bioreactors, which are preferred by some researchers because of their mechanical simplicity (Su et al., 1996), may not be able to achieve cell concentrations as high as those obtained in stirred tanks (Hsiao et al., 1999).

#### *Mechanically agitated*

As previously mentioned, high density plant cell suspensions exhibit rheological properties that are highly challenging. The main advantage of stirred-tank bioreactors is to provide high oxygen transfer rates, combining the synergistic effects of gas sparging and mechanical agitation (Huang and McDonald, 2009). However, selecting a stirred-tank bioreactor configuration mainly consists in the selection of the impeller module. Various impeller designs originally developed for the chemical industry were assayed for plant cells (reviewed by Doran, 1999). The Rushton impeller is widely used for microbes but it generates high-shear conditions that can be deleterious to the fragile plant cells, and this radial flow impeller is not efficient with highly non-Newtonian fluids. Pitched blade turbines and helical-ribbon impeller(s) are axial-flow impellers which generate a liquid pumping effect (upward or downward) reducing significantly the shear stress to which the cells are exposed (Jolicoeur et al., 1992). At industrial scale, stirred tanks (unknown agitator

configuration) of up to 75 m<sup>3</sup> have been used (Diversa; Ahrensburg, Germany) for suspension cell cultures of *Echinacea purpurea*, *Rauwolfia serpentina*, and of other species for the production of secondary metabolites in a process involving a cascade of five stirred tank bioreactors (75, 750, 7,500, 15,000, and 75,000 L) (Ritterhauss et al., 1990).

#### *Wave or plastic made*

A new trend in the biopharmaceutical industry is to use disposable bioreactors. Made of biocompatible materials, these bioreactors are cheap and have the advantage of reducing cleaning, sterilisation and maintenance costs compared to stainless steel bioreactors (Singh, 1999). They were assayed for plant and animal cell cultures as well as for transgenic roots (Kilani and Lebeault, 2007). Different designs are currently on the market or being developed. The most common, the "Wave bioreactor" (WAVE Biotech) consists in an instrumented (dissolved O<sub>2</sub> probe, pH, etc.) plastic bag fixed on a rocking table. Since the bag is not completely filled with culture medium, the movement of the rocking table induces waves enabling mixing and aeration of the cell suspension. Ranging from 2-L to 1-m<sup>3</sup> scale, these bags can be filled from 10 to 50 % of their maximum capacity (Okonkowski et al., 2007) compared to 70 % for standard reactors. Scale-up studies were performed replacing the rocking table by a vibrating platform (Kilani and Lebeault, 2007). Terrier et al. (2007) also suggested variants with a two raising platform bag and a slug bubble bioreactor design. Made of a vertical tube filled with medium, the aeration and mixing are created by the ascension of a big bubble in the tube (slug bubble). In order to have this kind of bubble, it is essential to have a high gas velocity in a small diameter. Finally, plastic-made "inserts" bioreactors are now designed to be fitted directly inside an existing stainless steel bioreactor unit, being mechanically agitated or gas-lift. This has the advantage of minimizing

direct contacts with stainless steel, from which  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ , etc., can leach into the medium and affect product quality since many proteins show high affinity for these metal ions. Protalix Therapeutics is using plastic bag bioreactors for the production of UPLYSO, a glucocerebrosidase, in carrot suspension cells ([www.protalix.com](http://www.protalix.com)). To the long term and at large industrial scale for producing kgs of recombinant proteins, the economical and environmental advantages of using plastic-made bioreactors still have to be demonstrated.

#### *Bioreactors allowing continuous harvesting of recombinant proteins*

The continuous harvesting of recombinant protein along with cell culture requires the protein to be secreted in the culture medium. This approach could significantly contribute to decrease the costs for DSP while decreasing the amount of required steps (Evangelista et al., 1998), as well as offering a solution to the production of proteins with short half-lives. Since the concentration of protein in a culture medium is a result of the protein synthesis/secretion rate minus their degradation rate, a perfusion system combined with a purification step rapidly removing the protein from the culture medium can help to increase the net productivity of a bioprocess (Castilho et al., 2002). Moreover, *in situ* product separation may mitigate the effects of protein instability and help to circumvent product inhibition effects (James et al., 2002). Modified bioreactor configurations allowing medium perfusion have thus been proposed. It is important to note here that those perfusion bioreactors can be either operated in batch mode, with 100% of the perfusion flow being recirculated to the bioreactor, or in a continuous mode, with a part (up to 100%) of the perfusion flow being withdrawn and compensated by a fresh medium feed.

Medium perfusion can be achieved by filtration or sedimentation of the cells, but the latter approach is easier to implement and creates less shear damage (Su et al., 1996). Since filters

rapidly clogged at high cell density, many studies preferred cell sedimentation to separate cells from medium. Su et al. (1996) developed a perfusion method based on a gas-lift bioreactor combined with an external loop where cells are carried with the flow sediment. A baffle prevents cells from being pumped out of the reactor with the medium. Another approach consists in the continuous separation of the cells with sedimentation columns (De Dobbeleer et al., 2006a). Placed inside the bioreactor and having baffles at their entrance, the columns allow the formation a stable clear front of sedimentation. The height of this front is a function of cell aggregate size, agitation speed in the bioreactor and medium pumping speed in the sedimentation column. With this system, the highest perfusion rate achieved for *Escholtzia californica* cell suspension at 30-35% sedimented cell volume (SCV) or 8-10 gDW L<sup>-1</sup> was 20.4 d<sup>-1</sup>, for the production of secondary metabolites. Such a high perfusion rate would reduce the average residence time of recombinant protein in the medium down to 1.2 h. This bioreactor configuration even allowed high cell density culture of 44 % PCV with a dilution rate of 5 d<sup>-1</sup> and was shown to work with even higher cell density cultures of 60% and 70 % PCV but at a lower dilution rate. In experiments aiming at expressing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) in *N. tabacum* cells, it was shown that a higher perfusion rate could dilute proteases in the medium and increase hGM-CSF yield (Lee et al., 2004). Different *in situ* protein recovery systems were developed using adsorbents, metal affinity chromatography or aqueous two-phase systems (Lee et al., 2004). Perfusion of fresh medium may be a good way to extend production phase and maintain high cell density (i.e. high volumetric productivity) (Su and Arias, 2003), and culture parameters such as perfusion starting time and medium composition are crucial and need to be optimized (Dowd et al., 2001). Such an approach, with an optimized culture medium management along a bioreactor culture, thanks to the perfusion of fresh medium, has been

demonstrated to be successful for the production of secondary metabolites by *E. californica* (Cloutier et al., 2009).

#### **2.2.3.3.2 Addition of compounds to prevent protein loss and proteolysis**

Different compounds may be added to the medium to stabilize or protect secreted recombinant proteins. The use of a mix of protease inhibitors were shown to prevent proteolysis, but they generally have a short half-life and can significantly increase the cost of the bioprocess (Huang et al., 2009). Interestingly, similar results to those obtained with protease inhibitors were achieved by adding EDTA (Schiermeyer et al., 2005). Indeed, capturing divalent cations required for metalloproteases with EDTA in BY-2 cells medium significantly increased levels of plasminogen activator  $\alpha 1$ . Proteases can be liberated from cell lysis and the use of osmotic agents like mannitol or NaCl can help to prevent cell disruption, thus reducing recombinant protein degradation (Lee et al., 2002; Terashima et al., 1999). Studies reporting the use of mannitol in order to induce an osmotic stress also lead to increased recombinant protein production and secretion (Lee et al., 2002; Soderquist and Lee, 2005). Controlling pH may be another alternative. A recent study demonstrated that raising pH from 5-6 (usual pH value of plant cell medium) to 7-8 range could help stabilizing recombinant proteins, and reduce protease activity, which is maximal around pH 5.0 (Huang et al., 2009). Even if recombinant protein production was not increased at pH 7-8, the feasibility of using a pH stress with plant cells without significantly affecting their viability has clearly been demonstrated. Protein-based stabilizing agents like bovine serum albumin (BSA), gelatin and other low-cost protein like albumin can reduce recombinant protein loss by competing for non-specific adsorption to the surface of the bioreactor and/or act as sacrificial substrate for proteases (Doran, 2006b). Finally, stabilizing agents like

polyvinylpyrrolidone (PVP) (Wongsamuth and Doran, 1997), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wahl et al., 1995), polyethylene glycol (PEG) and Pluronic F-68 (Lee and Kim, 2002) have also given good results in order to protect recombinant proteins from denaturation (Huang et al., 2009). The use of additives has however some drawbacks since they could exhibit negative effects on cell growth in addition to increase downstream processing costs (Huang et al., 2009).

Plant cell culture productivity in secondary metabolites, and more recently in recombinant proteins, are known to exhibit high level of variability, which may limit their economical feasibility and acceptance by the regulatory agencies. A plant cell is highly sensitive to its nutritional environment and may evolve differently after perturbations in medium composition (Lamboursain and Jolicoeur, 2005). The control of the cells nutritional state is thus of critical importance to ensure a high level of production reproducibility.

Mathematical models are the unique way to predict and simulate cell state; they allow the estimation of essential off-line data using a defined set of on-line data (Clementschi and Bayer, 2006). Modelling major biochemical pathways allows anticipation of cell reactions to a given nutritional stress and eventually, improve yields consistency. A recent nutritional model developed by Cloutier et al. (2008) for either hairy roots of *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* as well as suspension cells of *E. californica* was shown to be sensitive to initial concentrations of extracellular inorganic phosphate, sugars or nitrate, hence indicating that, as initially suggested by Lamboursain and Jolicoeur (2005), sub-culture history is important due to plant cells nutrients accumulation capacities (Jolicoeur, 2006). When applied to a *Eschscholtzia californica* cell culture, it was demonstrated that, as predicted by the model, that the control of intracellular levels of glucose and nitrogen reserve using an adaptive medium management



strategy lead to a raise of up to 129 % of total secondary metabolites production when compared to standard batch protocol (Cloutier et al., 2009). Even if these modelling studies focused on secondary metabolites production, it is expected that similar approach can be applied to recombinant protein production bioprocesses; a mathematical model is describing the cell behavior and thus allow to determine in real time what can be the "optimal" culture medium change in order to optimize either cell growth and/or cell productivity in recombinant protein.

The main advantage of using bioreactors versus plants cultivated in fields or leaves agroinfiltration is the capacity to control and optimize the environment in which the cells are cultured. The ability to directly monitor or to estimate cellular physiology during the culture with metabolic models (Cloutier et al., 2008; Cloutier et al., 2009) can bring reliable information to determine the best timing of chemical inducer supply and/or for the best product harvest time. This novel approach has the potential to impact overall volumetric productivity and reproducibility of a bioprocess (Trexler et al., 2002). Many common probes can be used to follow parameters like pH, dissolved oxygen, carbon dioxide production and biomass. However, traditional parameters like biomass, substrate and product are not enough to characterize a process (Becker et al., 2007). In order to improve bioprocess monitoring and feed metabolic models running in parallel to the cultures, probes being able to bring a better description of cell physiological state need to be developed. On that note, probes based on natural fluorescence of various metabolites have been demonstrated to provide good estimation of cell concentration and metabolic activity (Hisiger and Jolicoeur, 2005). An exhaustive review was recently published on the future aspects of this particular topic (Becker et al., 2007). Finally, a unique approach was also developed for the at-line monitoring of bioreactor protein production by harnessing a Surface

Plasmon Resonance-based (SPR) biosensor to a bioreactor (Jacquemart et al., 2007). This method may be highly useful in order to control adequately production bioprocess.

#### **2.2.4 Conclusion and future trends**

In this revue, we have presented the specific niches of each production platform dedicated to bioactive recombinant protein production. It is clear that the criterion for selecting a platform is the economical competitiveness and it includes a list of factors ranging from the time-to-market capability to the ease of homologation by the regulatory agencies. In that context, *in vitro* plant cell culture is an emerging, highly promising platform for molecular farming and has already many therapeutics in the pipeline. The approval of these molecules will facilitate the acceptance of the plant-based recombinant proteins that will be followed by regulation authorities such as the FDA and the EMEA. The development of a *in vitro* platform capable of producing high amounts of recombinant protein in a highly reproducible fashion will require, however, the development of optimized genetic constructs, viral suppressors and bioprocesses supported by efficient modelling and monitoring tools.

**Acknowledgements**

This work was supported by the Fonds Québécois de la recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) and the Canada Research Chairs in Applied Metabolic Engineering (MJ), on Protein-Enhanced Biomaterials (GDC) and in Functional Genomics and Plant Signal Transduction (DPM). Eric B. Boivin held a Ph. D. scholarship from the FQRNT.

### 2.2.6 References

- Achstetter T, Nguyen-Juilleret M, Findeli A, Merkamm M and Lemoine Y (1992) A new signal peptide useful for the secretion of heterologous proteins and its application for the synthesis of hirudin. *Gene* **110**:25-31.
- Agathos SN (1996) Insect cell bioreactors. *Cytotechnology* **20**:173-189.
- Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ and Smales CM (2005) The Cold-Shock Response in Cultured Mammalian Cells: Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering* **93**:829-835.
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH and März L (1999) Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **16**:109-123.
- Andrews LB and Curtis WR (2005) Comparison of Transient Protein Expression in Tobacco Leaves and Plant Suspension Culture. *Biotechnology Progress* **21**:946-952.
- Baneyx F (1999a) In vivo folding of recombinant proteins in *Escherichia coli*, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Davies JE, Demain, A.L., Cohen, G., Hershberger, C.L., Forney, L.J., Holland, I.B., Hu, W.S., Wu, J.H.D., Sherman, D.H., Wilson, R.C. ed) pp 551-565, Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Baneyx F (1999b) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**:411-421.
- Baneyx F and Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **22**:1399-1408.
- Baulcombe DC and Molnar A (2004) Crystal Structure of p19 - A Universal Suppressor of RNA Silencing. *TRENDS in Biochemical Science* **29**:279-281.

- Becker T, Hitzmann B, Muffler K, Pörtner R, Reardon KF, Stahl F and Ulber R (2007) Future Aspects of Bioprocess Monitoring. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **105**:249-293.
- Ben-Maimon C and Garnick R (2006) Biogenerics at the crossroads. *Nature Biotechnology* **24**:268-269.
- Bernard AR, Kost TA, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, Yahia-Cherif ZC, C. and Mills A (1994) Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: comparison with the baculovirus system. *Cytotechnology* **15**:139-144.
- Bethencourt V (2009) Virus stalls Genzyme plant. *Nature Biotechnology* **27**:681-681.
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Peterson F, Gleba Y and Raskin I (1999) Production of recombinant proteins in plant roots exudates. *Nature Biotechnology* **17**:466-469.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D and Demeneix B (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**:7297-7301.
- Bretthauer RK and Castellino FJ (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30**:193-200.
- Brodersen P and Voinnet O (2006) The Diversity of RNA Silencing Pathways in Plants. *TRENDS in Genetics* **22**:268-280.
- Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JHW, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z and Koprowski H (2006) Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**:8804-8809.

- Cai Y, Sun J, Wang J, Ding Y, Tian N, Liao X and Xu W (2008) Optimizing the codon usage of synthetic gene with QPSO algorithm. *Journal of Theoretical Biology* **254**:123-127.
- Castilho LR, Anspach FB and Deckwer WD (2002) An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnology Progress* **18**:776-781.
- Chalmers JJ (1996) Shear sensitivity of insect cells. *Cytotechnology* **20**:163-171.
- Chan MT and Yu SM (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6543-6547.
- Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, Qi Q and Wang PG (2005) Modification of plant N-glycans processing: the future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Medicinal Research Reviews* **25**:343-360.
- Chew NJ (1993) Emerging technologies : transgenic therapeutics. *Biopharm* **6**:24-26.
- Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, Carrington JC and Dolja VV (2006) Diverse Suppressors of RNA Silencing Enhance Agroinfection by a Viral Replicon. *Virology* **346**:7-14.
- Cho JS, Hong SM, Joo SY, Yoo JS and Kim DI (2007) Cryopreservation of transgenic rice suspension cells producing recombinant hCTLA4Ig. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**:1470-1476.
- Choi B-K, Bobrowick P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S and Gerngross TU (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**:5022-5027.
- Choi JH and Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**:625-635.

- Chou CP (2007) Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**:521-532.
- Chuck AS, Distler A, Sander SA, Deshpande RR, Nyberg G and Seely JE (2009) *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis*. Verlag, Switzerland.
- Chung IS, Taticek RA and Shuler ML (1993) Production of human alkaline phosphatase, a secreted, glycosylated protein from a baculovirus expression system and the attachment-dependent cell line *Trichoplusia ni* BTI-Tn 5B1-4 using a split-flow, air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress* **9**:675-678.
- Clementschitsch F and Bayer K (2006) Improvement of Bioprocess Monitoring: Development of Novel Concepts. *Microbial Cell Factories* **5**:1-11.
- Cloutier M, Bouchard-Marchand É, Perrier M and Jolicoeur M (2008) A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering* **99**:189-200.
- Cloutier M, Chen J, De Dobbeleer C, Perrier M and Jolicoeur M (2009) A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant Biotechnology Journal* (**in press**).
- Collens JI, Lee DR, Seeman AM and Curtis WR (2004) Development of Auxotrophic *Agrobacterium tumefaciens* for Gene Transfer in Plant Tissue Culture. *Biotechnology Progress* **20**:890-896.
- Coloma MJ, Clift A, Wims L and Morrison SL (2000) The role of carbohydrate in the assembly and function of IgG1. *Molecular Immunology* **37**:1081-1090.
- Corrado G and Karali M (2009) Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnology Advances* **27**:733-743.
- Dale C, Allen A and Fogarty S (1999) *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm* **12**:36-42.

- De Dobbeleer C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R and Jolicoeur M (2006) A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Soumis*.
- De Wilde C, Van Houdt H, De Buck S, Angenon G, De Jager G and Depicker A (2000) Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of the transgene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**:347-359.
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J and Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology* **127**:852-862.
- Demain AL and Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* **27**:297-306.
- Dingermann T (2008) Recombinant Therapeutic Proteins: Production Platforms and Challenges. *Biotechnology Journal* **3**:90-97.
- Doran PM (1993) Design of reactors for plant cells and organs. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **48**:115-168.
- Doran PM (1999) Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspension in Stirred Reactors. *Biotechnology Progress* **15**:319-335.
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* **11**:199-204.
- Doran PM (2006a) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *TRENDS in Biotechnology* **24**:426-432.
- Doran PM (2006b) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *Journal of Biotechnology* **122**:39-54.
- Dowd JE, Kwok KE and Piret JM (2001) Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **75**:252-256.



- Drake PM, Chargelegue DM, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Obregon P and Ma JK (2003) Rhizosecretion of monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology* **52**:233-241.
- Durocher Y, Perret S and Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research* **30**:E9.
- Dyck MK, Gagné D, Ouellet M, Sénéchal J-F, Békanger E, Lacroix D, Sirard MA and Pothier F (1999) Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nature Biotechnology* **17**:1087-1090.
- Ecamilla-Trevino LL, Viader-Salvado JM, Barrera-Saldana HA and Guerrero-Olazarán M (2000) Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **22**:109-114.
- Eiteman MA and Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology* **24**:530-536.
- Elbers IJ, Stoop GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJ, Bosch D and Lommen A (2001) Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous protein in tobacco leaves. *Plant Physiology* **126**:1314-1322.
- Evangelista RL, Kusnadi AR, Howard JA and Nikolov ZL (1998) Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant  $\beta$ -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress* **14**:607-614.
- Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E and Villaverde A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* **8**.

- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004) Plant-Based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:152-158.
- Fogolin MB, Wagner R, Etcheverrigaray M and Kratje R (2004) Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology* **109**:179-191.
- Fowler MW (1982) The large scale cultivation of plant cells. *Progress in Industrial Microbiology* **16**:207-229.
- Friedman B, Vaddi K, Preston C, E. M, Cataldo JR and McPherson JM (1999) A comparison of the pharmaceutical properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived  $\beta$ -glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood* **93**:2807-2816.
- Fujita J (1999) Cold shock response in mammalian cells. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**:243-255.
- Fujita Y, Tohda H, Giga-Hama Y and Takegawa K (2006) Heat shock-inducible expression vectors for use in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research* **6**:883-887.
- Gallie DR, Tanguay RL and Leathers V (1995) The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* **165**:233-238.
- Gasser B and Mattanovich D (2007) Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale ? *Biotechnology Letters* **29**:201-212.
- Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N and Raskin I (2003) Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Reports* **21**:1188-1193.
- Geisse S and Henke M (2006) Large-scale transient transfection of mammalian cells: A newly emerging attractive option for recombinant protein production. *Journal of Structural and Functional Genomics* **6**:165-170.

- Gellison G, Janowick ZA, Weydemann U, Melber K, Strasser AWM and Hollenberg CP (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances* **10**:179-189.
- Gemmil TR and Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharides structure found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**:227-237.
- Gerngross TU (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **22**:1409-1414.
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette A-C, Bardor M, Pagnt S, Lerouge P and Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal* **2**:83-100.
- Gouka RJ, Punt PJ and van den Hondel CAMJJ (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**:1-11.
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M and Conradt HS (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal* **16**:81-97.
- Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, Dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, I.A. W, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC,

- Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büsow K and Gunsalus KC (2008) Protein production and purification. *Nature Methods* **5**:135-146.
- Graumann K and Premstaller A (2006) Manufacturing of Recombinant Therapeutic Proteins in Microbial Systems. *Biotechnology Journal* **1**:164-186.
- Gressel J (1979) Blue light photoreception. *Photochemistry and Photobiology* **30**:749-754.
- Griesbeck C, Kobl I and Heitzer M (2006) Chlamydomonas reinhardtii : a Protein Expression System for Pharmaceutical and Biotechnological Proteins. *Molecular Biotechnology* **34**:213-223.
- Grillberger L, Kreil T, R., Nasr S and Reiter M (2009) Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal* **4**:186-201.
- Group NP (2003) Barnyard Biotech - Lame Duck or Golden Goose. *Nature Biotechnology* **21**:965-967.
- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Kumar Pati P, Rideau M and Gantet P (2006) Hairy Root Research: Recent Scenario and Exciting Prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:341-346.
- Gustafsson C, Govindarajan S and Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**:346-353.
- Hamada A, Yamaguchi K-I, Ohnishi N, Harada M, Nikumar S and Honda H (2005) High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene. *Plant Biotechnology Journal* **3**:43-55.

- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* **22**:1415-1422.
- Hisiger S and Jolicoeur M (2005) Plant cell culture monitoring using an in situ multiwavelength fluorescence probe. *Biotechnology Progress* **21**:580-589.
- Hisiger S and Jolicoeur M (2007) Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochemistry Reviews* **6**:207-234.
- Hjortso M (1997) Mathematical modelling of hairy root cultures, in *Hairy roots culture and applications* (Doran PM ed) pp 169-178, Amsterdam: Harwood Academic Publisher.
- Horsch RB, J.E. F, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT (1985) A simple and general-method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231.
- Houdebine L-M (2002) Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:625-629.
- Houdebine L-M (2009) Production of pharmaceuticals proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases* **32**:107-121.
- Hsiao TY, Bacani FT, Carvalho EB and Curtis WR (1999) Development of a low capital investment reactor system: application for plant cell suspension culture. *Biotechnology Progress* **15**:114-122.
- Huang SY, Shen YW and Chan HW (2002) Development of a bioreactor operation strategy for L-DOPA production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:779-791.
- Huang T-K and McDonald KA (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal* **45**:168-184.

- Huang T-K, Plesha MA, Falk BW, Dandekar AM and McDonald KA (2009) Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **102**:508-520.
- Huynh CQ and Zieler H (1999) Construction of molecular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *Journal of Molecular Biology* **288**:13-20.
- Ikonomou L, Schneider YJ and Agathos SN (2003) Insect culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**:1-20.
- Jacquemart R, Chavane N, Durocher Y, Hoemann C, de Crescenzo G and Jolicoeur M (2007) At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnology and Bioengineering* **100**:184-188.
- James E, Mills DR and Lee JM (2002) Increased production and recovery of secreted foreign proteins from plant cell cultures using an affinity chromatography. *Biochemical Engineering Journal* **12**:205-213.
- Jana S and Deb JK (2005) Strategies for Efficient Production of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**:289-298.
- Jarvis DL (2003) Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production *Virology* **310**:1-7.
- Jenkins N, Meleady P, Tyther R and Murphy L (2009) Strategies for analysing and improving the expression and quality of recombinant proteins made in mammalian cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **53**:73-83.

- Joh LD and VanderGheynst JS (2006) Agroinfiltration of plant tissues for production of high-value recombinant proteins: an alternative to production in transgenic crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**:2002-2006.
- Jolicoeur M (2006) Thoughts and tools for reducing variability of *in vitro* tissue and bioreactor cultures, in *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II* (Teixeira da Silva JA ed) p 571: Global Science Books.
- Jolicoeur M, Bouchard-Marchand É, Bécard G and Perrier M (2003) Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Ecological Model* **163**:247-267.
- Jolicoeur M, Chavarie C, Carreau P and Archambault J (1992) Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture. *Biotechnology and Bioengineering* **39**:511-521.
- Jordan M and Wurm F (2004) Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* **33**:136-143.
- Joshi L, Shuler ML and Wood HA (2001) Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells. *Biotechnology Progress* **17**:822-827.
- Jungbauer A (2007) Editorial: Bipharmaceutical Technologies. *Biotechnology Journal* **2**:647.
- Kamarck ME (2006) Building Biomanufacturing Capacity - the Chapter and Verse. *Nature Biotechnology* **24**:503-505.
- Kapila J, De Rycke R, van Montagu M and Angenon G (1996) Agrobacterium mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**:101-108.
- Karhunen T, Mäntylä A, Navalainen KMH and Suominen PL (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics* **241**:515-522.

- Kaulen H, Schell J and Kreuzaler F (1986) Light-induced expression of the chimeric chalcone synthase-NPTII gene in tobacco cells. *The EMBO Journal* **5**:1-8.
- Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J, Wu H and Li Y (2006) Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta* **223**:1090-1100.
- Kilani J and Lebeault J-M (2007) Study of the Oxygen Transfer in a Disposable Flexible Bioreactor with Surface Aeration in Vibrated Medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**:324-330.
- Kim KI, Sunter G, Bisaro DM and Chung IS (2007) Improved expression of recombinant GFP using a replicating vector based on *Beet curly top virus* in leaf-disks and infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Molecular Biology* **64**:103-112.
- Kim MO, Kim SH, Lee SR, Kim KS, Min KS, Lee HT, Kim SJ and Ryoo ZY (2006) Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-GSF) into mouse urine. *Life Sciences* **78**:1003-1009.
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME and Maliga P (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particule bombardment process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**:8502-8505.
- Ko K, Steplewski Z, Glogowska M and Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**:7026-7030.
- Koebnik R, Locher KP and Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* **37**:239-253.
- Komarnytsky S, Borisjuk N, Yakoby N, Garvey A and Raskin I (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiology* **141**:1185-1193.



- Kost TA, Condreay PJ and Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* **23**:567-575.
- Kulakosky PC, Hughes PR and Wood HA (1998) N-linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* **8**:741-745.
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ and Bapat VA (2005) Secretion of hepatitis B surface antigen in transformed tobacco cell suspension cultures. *Biotechnology Letters* **27**:927-932.
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ and Bapat VA (2006) Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science* **170**:918-925.
- Kusnadi AR, Nikolov Z and Howard JA (1997) Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56**:473-484.
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D and Burgyan J (2004) Molecular Mechanism of RNA Silencing Suppression Mediated by p19 Protein of Tombusviruses. *EMBO Journal* **23**:876-884.
- Lamboursain L, St-Onge F and Jolicoeur M (2002) A Lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology Progress* **18**:1377-1386.
- Larrick JW and Thomas DW (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:411-418.
- Le ATT and Schumann W (2007) A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification* **53**:264-269.
- Ledford H (2006) The Farmyard Drug Store. *Nature* **443**:16-17.

- Lee J-H, Kim N-S, Kwon T-H and Yang M-S (2002) Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:768-773.
- Lee K-T, Chen S-C, Chiang B-L and Yamakawa T (2007) Heat-inducible production of  $\beta$ -glucuronidase in tobacco hairy root cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**:1047-1053.
- Lee S-Y, Kim Y-H, Roh Y-S, Myoung H-J, Lee K-Y and Kim D-I (2004) Bioreactor operation for transgenic *Nicotiana tabacum* cell cultures and continuous production of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by perfusion culture. *Enzyme and Microbial Technology* **35**:663-671.
- Lee SY (1996) High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **14**:98-105.
- Lee SY and Kim DI (2002) Stimulation of murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by Pluronic F-68 and polyethylene glycol in transgenic *Nicotiana tabacum* cell culture *Biotechnology Letters* **24**:1779-1783.
- Li G-Q, Shin JH and Lee JM (1995) Mineral oil addition as a means of foam control for plant cell cultures in stirred tank fermenters. *Biotechnology Techniques* **9**:713-718.
- Liénard D, Sourrouille C, Gomord V and Faye L (2007) Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review* **13**:115-147.
- Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Ilgen C and Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:329-332.
- Liu C, Dalby B, Chen W, Kilzer JM and Chiou HC (2008) Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular Biotechnology* **39**:141-153.

- Liu C, Towler MJ, Medrano G, Cramer CL and Weathers PJ (2009) Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in a airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **102**:1074-1086.
- Ma JK-C, Drake PMW and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceuticals in plants. *Nature Rev Genet* **4**:794-805.
- Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in Applied Microbiology* **51**:81-106.
- Maras M, van Die I, Contreras R and van den Hondel CAMJJ (1999) Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glucoconjugate Journal* **16**:9-107.
- Massoud M, Attal J, Thépot D, Pointu H, Stinnakre MG, Théron MC, Lopez C and Houdebine L-M (1996) The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction, Nutrition, Development* **36**:555-563.
- Mayfield SP and Franklin SE (2005) Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae. *Vaccine* **23**:1828-1832.
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M and Marin-Navaroo J (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories *Current Opinion in Biotechnology* **18**:126-133.
- McCarroll L and King LA (1997) Stable insect cultures for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* **8**:590-594.
- Mergulhao FJM, Monteiro GA, Cabral JMS and Taipa MA (2004) Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**:1-14.

- Mergulhao FJM, Summers DK and Monteiro GA (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* **23**:177-202.
- Mett V, Farrance CE, Green BJ and Yusibov V (2008) Plants as biofactories. *Biologicals* **36**:354-358.
- Metz B and Kossen NWF (1997) Biotechnology review: the growth of molds in the form of pellets - a literature review. *Biotechnology and Bioengineering* **19**:781-799.
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *TRENDS in Biotechnology* **15**:45-50.
- Mirksch G, Betteworth F, Friehs K, Flashel E, Axel S, Twellmann T and Nattkemper TW (2005) Libraries of synthetic stationary-phase and stress promoter as a tool for fine-tuning of expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **120**:25-37.
- Mistry PK, Wraight EP and Cox TM (1996) Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. *The Lancet* **348**:1555-1559.
- Mochizuki S, Hamato N, Masaaki H, Miyano K, Ohtani W, Kameyama S, Kuwae S, Tokuyama T and Ohi H (2001) Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **23**:55-65.
- Mujacic M, Cooper KW and Baneyx F (1999) Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene*:325-332.
- Murashima K, Chen CL, Kosugi A, Tamaru Y, Doi RH and S.-L. W (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of Bacteriology* **184**:76-81.

- Nagata T, Nemoto Y and Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**:1-30.
- Nevalainen HKM, Te'o VSJ and Bergquist P (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology* **23**:468-474.
- Nikolo ZL and Woodard SL (2004) Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:479-486.
- Odell JT, Nagy F and chua NH (1985) Identification of DNA sequences for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**:810-812.
- Okita B, Arcuri E, Turner K, Sharr D, Del Tito B, Swanson J, Shatzman A and Zabriskie D (1989) Effect of induction temperature on the production of malaria antigens in recombinant *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **34**:854-862.
- Okonkowski J, Balasubramanian U, Seamans C, Fries S, Zhang J, Salmon P, Robinson D and Chartrain M (2007) Cholesterol Delivery to NSO Cells: challenges and Solutions in Disposable Linear Low-Density Polyethylene-Based Bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**:50-59.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW and Rothstein RJ (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:6354-6358.
- Padidam M (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:169-177.
- Parekh R (1989) Polypeptide glycosylation and biotechnology. *Biotech Eur* **6**:18-21.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL and Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**:3324-3328.

- Pham PL, Kamen A and Durocher Y (2006) Large-Scale transfection of mammalian cells for fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology* **34**:225-237.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology* **31**:245-259.
- Prins A and van't Riet K (1987) Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *TRENDS in Biotechnology* **5**:296-301.
- Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodriguez M, Gonzalez EM and Perez L (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology* **25**:455-459.
- Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T and Riazuddin S (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* **27**:753-763.
- Ratcliff F, MacFarlane S and Baulcombe DC (1999) Gene Silencing Without DNA:RNA-Mediated Cross Protection Between Viruses. *Plant Cell* **14**:689-702.
- Redwan E-RM (2009) Animal-derived pharmaceuticals proteins. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **30**:262-290.
- Reed JC, Kasschau KD, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Pogue GP, Carrington JC and Dolja VV (2003) Suppressor of RNA Silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* **306**:203-209.
- Rijhwani SK and Shanks JV (1998) Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:606-611.
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**:571-573.
- Ritterhauss E, Ulrich J and Westphal K (1990) Large-scale production of plant cell cultures. *IAPTC News* **61**:2-10.

- Ritz D and Beckwith J (2001) Roles of thio-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**:21-48.
- Roth BM, Pruss GJ and Vance VB (2004) Plant Viral Suppressors of RNA Silencing. *Virus Research* **102**:97-108.
- Ruiz-Diez B (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* **92**:189-195.
- Sahara T, Goda T and Ohgiya S (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic response in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry* **277**:50015-50021.
- Saidi Y, Finka A, Chakhporanian M, Zryd J-P, Schaefer DG and Goloubinoff P (2005) Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Molecular Biology* **59**:697-711.
- Sainsbury F and Lomonosoff GP (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiology* **148**:1212-1218.
- Salovouri I, Makarow M, Rauvala H, Knowles J and Kääriäinen L (1987) Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **5**:152-156.
- Sandhu KS, Pandey S, Maiti S and Pillai B (2008) GASCO: genetic algorithm simulation for codon optimization. *In Silico Biology* **8**:187-192.
- Sandkvist M and Bagdasarian M (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **7**:505-511.

- Schatz SM, Kerschbaumer RJ, Gerstenbauer G, Kral M, Dorner F and Scheiflinger F (2003) Higher expression of fab antibody fragment in CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnology and Bioengineering* **84**:433-438.
- Schiermeyer A, Schinkel H, Apel S, Fischer R and Schillberg S (2005) Production of Desmodus rotundus salivary plasminogen activator  $\alpha 1$  (DSPA $\alpha 1$ ) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **89**:848-858.
- Schillberg S, Twyman RM and Fischer R (2005) Opportunities for recombinants antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine* **23**:1764-1769.
- Schlaeger E-J (1996) Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* **20**:57-70.
- Schmale K, Rademacher T, Fischer R and Hellwig S (2006) Towards industrial usefulness - cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *Journal of Biotechnology* **124**:302-311.
- Schmidt FR (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**:363-372.
- Serrato JA, Hernandez V, Estrada-Mondaca S, Palomares LA and Ramirez OT (2007) Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **47**:113-124.
- Sharma A, K. and Sharma M, K. (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27**:811-832.
- Sharp PM and Li WH (1987) The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research* **15**:1281-1295.



- Shekhawat UKS, Ganapathi TR, Srinivas L, Bapat VA and Rathore TS (2008) Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Santalum album* L. *Plant Cell Tissus and Organs Culture* **92**:261-271.
- Shih S, M.-H. and Doran PM (2009) Foreign protein production using plant cell and organ cultures: Advantages and limitations. *Biotechnology Advances* **27**:1036-1042.
- Shokri A, Sanden AM and Larsson G (2003) Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**:654-664.
- Siegelman HW, Turner BC and Hendricks SB (1966) The chromophore of phytochrome. *Plant Physiology* **41**:1289-1292.
- Sinclair AM and Elliott S (2005) Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**:1626-1635.
- Singh V (1999) Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* **30**:149-158.
- Smith GE, Summers DK and Fraser MJ (1983) Production of human b-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* **3**:2156-2165.
- Soderquist RG and Lee JM (2005) Enhanced production of recombinant proteins from plant cells by the application of osmotic stress and protein stabilization. *Plant Cell Reports* **24**:127-132.
- Soler E, Thépot D, Rival-Gervier S, Jolivet G and Houdebine L-M (2006) Preparation of recombinant proteins in ilk to improve human and animal health. *Reproduction, Nutrition, Development* **46**:579-588.

- Spena A, Hain R, Ziervogel U, Saedler H and Schell J (1985) Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila hsp70* promoter in plants. *The EMBO Journal* **4**:2739-2743.
- Srivastava S and Srivastava AK (2007) Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* **27**:29-43.
- Stacey G and Possee R (1996) Safety aspects of insect cell culture. *Cytotechnology* **20**:299-304.
- Su WW and Arias R (2003) Continuous plant cell perfusion culture: bioreactor characterization and secreted enzyme production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**:13-20.
- Su WW, He BJ, Liang H and Sun S (1996) A perfusion air-lift bioreactor for high density plant cell cultivation and secreted protein production. *Journal of Biotechnology* **50**:225-233.
- Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell KJ, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S and Logan JS (1992) Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology* **10**:557-559.
- Tanaka H (1982) Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. *Biotechnology and Bioengineering* **24**:425-442.
- Taticek RA, Moo-Young M and Legge RL (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **24**:139-159.
- Taura T, Kusukawa N, Yura T and Ito K (1989) Transient shut off of Escherichia coli heat shock protein synthesis upon temperature shift down. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **163**:438-443.
- Teoh KH, Weathers PJ, Cheetham RD and Walcerz DB (1996) Cryopreservation of transformed (hairy) roots of *Artemisia annua*. *Cryobiology* **33**:106-107.
- Terashima M, Ejiri Y, Hashikawa N and Yoshida H (1999) Effect of osmotic pressure on human  $\alpha_1$ -antitrypsin production by plant cell culture. *Biochemical Engineering Journal* **4**:31-36.

- Tiwari S, Verma P, C., Singh PK and Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccines antigens. *Biotechnology Advances* **27**:449-467.
- Tomiya N, Betenbaugh MJ and Lee Y, C. (2003) Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins. *Accounts of Chemical Research* **36**:613-620.
- Trexler MM, McDonald KA and Jackman AP (2002) Bioreactor production of human  $\alpha$ 1-Antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnology Progress* **18**:501-508.
- Tsao EI, Bohn MA, Numsuwan V, Omstead DR and Munster MJ (1992) Effects of heat shock on the production of human erythropoietin from recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* **40**:1190-1196.
- Twyman RM (2004) Host plants, systems and expression strategies for molecular farming, in *Molecular Farming* (Fischer R and Schillberg S eds) pp 191-216: Wiley-VCH.
- Twyman RM, Stroger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* **21**:570-578.
- Valax P and Georgiou G (1993) Molecular characterization of  $\beta$ -lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **9**:539-547.
- Vance V and Vaucheret H (2001) RNA Silencing in Plants - Defense and Counterdefense. *Science* **292**:2277-2280.
- Vaucheret H, Beclin C and Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**:3083-3091.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**:669-687.
- Voinnet O, Lederer C and Baulcombe DC (2000) A Viral Movement protein Prevents Systemic Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**:157-167.

- Voinnet O, Pinto YM and Baulcombe D (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**:14147-14152.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D (2003) An Enhanced Transient Expression System in Plants Based on Suppression of Gene Silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**:949-956.
- Wahl MF, An G and Lee JM (1995) Effects of dimethyl sulfoxide on heavy chain monoclonal antibody production from plant cell culture. *Biotechnology Letters* **17**:463-468.
- Walmsley AM and Arntzen CJ (2000) plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* **14**:145-150.
- Walsh G (2003) Biopharmaceutical benchmarks - 2003. *Nature Biotechnology* **21**:865-870.
- Walsh G (2005) Biopharmaceuticals: Recent Approvals and likely Directions. *TRENDS in Biotechnology* **23**:553-558.
- Walsh G (2006) Biopharmaceutcial Benchmarks 2006. *Nature Biotechnology* **24**:769-776.
- Wang L, Ridgway D, Gu T and Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* **23**:115-129.
- Westers L, Westers H and Quax WJ (2004) Bacillus subtilis as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**:299-310.
- Wongsamuth R and Doran PM (1994) Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams. *Biotechnology and Bioengineering* **44**:481-488.
- Wongsamuth R and Doran PM (1997) Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering* **54**:401-415.

- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* **22**:1393-1398.
- Wydro M, Kozubek E and Lehmann P (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* **53**:289-298.
- Yatsuhashi H, Hashimoto T and Shimizu S (1982) Ultraviolet action spectrum for anthocyanin formation in broom sorghum first internodes. *Plant Physiology* **70**:735-741.
- Yoon SK, Song JY and Lee GM (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in chinese hamster ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **82**:289-298.
- Yoshida K, Kasai T, Garcia MRC, Sawada S, Shoji T, Shimizu S, Yamazaki K, Komeda Y and Shinmyo A (1995) Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the *HSP18.2* promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**:466-472.
- Yoshida N and Sato M (2009) Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**:791-798.
- Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisin S, Denq DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, R.M. K, Kerchner A, Leighton PA, Mather CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiaccinto P, Wong S, Zhou W and Etches RJ (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology* **23**:1159-1169.

## CHAPITRE 3: HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

### 3.1. Hypothèses

Tels que mentionné précédemment, les faibles rendements en protéines recombinantes obtenus jusqu'à maintenant avec la plateforme végétale *in vitro* constituent un obstacle majeur à l'adoption de cette plateforme par l'industrie comme méthode de production. Les travaux présentés dans cette thèse s'appuient sur l'hypothèse que la plateforme végétale *in vitro* peut être modifiée pour atteindre les niveaux de production observés pour les autres plateformes. Afin de valider cette hypothèse, deux approches ciblant l'augmentation de la productivité spécifique des cellules de plante ont été étudiées en parallèle. Ces approches suggéraient donc que la production de protéines recombinantes pourrait être augmentée en 1) améliorant les niveaux d'expression en co-cultivant les cellules de plantes avec *Agrobacterium* pour exprimer de façon transitoire un gène d'intérêt et un suppresseur viral et 2) par l'utilisation de promoteurs forts inductibles au froid.

### 3.2. Objectifs

Le premier volet expérimental de cette thèse, constituant le Chapitre 4, avait pour objectif d'étudier et de valider la possibilité de transformer en mode transitoire des cellules de plantes en les cocultivant simultanément avec plusieurs souches d'*Agrobacterium*. Parmi les lignées végétales disponibles au laboratoire (*Catharanthus roseus* et EC6 (*Escholtzia californica*)) précédemment utilisées pour la production d'alcaloïdes à intérêt thérapeutique, aucune ne se prêtaient à la production de protéines recombinantes en raison de la difficulté à les transformer génétiquement. Par conséquent, une lignée de *Nicotiana tabacum* (NT1) nous a été fournie par le laboratoire du Dre Nathalie Beaudoin de l'Université de Sherbrooke. Cette lignée a d'ailleurs été

utilisée initialement pour le second objectif, mais en raison de tests d'agroinfiltration effectués par la suite au laboratoire qui démontraient l'obtention de meilleurs taux de production avec l'espèce *N. benthamiana*, il a été opté de travailler avec cette dernière pour cet objectif. Une lignée cellulaire de *N. benthamiana* en suspension a été développée; cette plante étant reconnue pour sa facilité de transformation par *Agrobacterium* (Villani et al., 2008), mais également pour son taux de croissance rapide (Nagata et al., 1992). Deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* distinctes ont été utilisées, à savoir l'une ayant les deux gènes (chaînes lourde et légère) de notre protéine d'intérêt, une immunoglobuline 1 (IgG1) de souris et l'autre le suppresseur viral p19 issu du *tomato bushy stunt virus*. En raison de la capacité de la plateforme végétale à assembler des protéines multimériques et glycosylées, le choix de produire une protéine complexe telle une immunoglobuline s'imposait si nous voulions démontrer le potentiel de ce système. De plus, cette protéine devait pouvoir être sécrétée par les cellules dans le milieu de culture ce qui faciliterait les étapes de purification et comme un bioréacteur à perfusion a précédemment été développé au laboratoire (De Dobbeleer et al., 2006), un procédé avec récolte en continue aurait pu être développé par la suite. Le choix du suppresseur viral p19 vient quant à lui du fait qu'il s'agit du suppresseur le plus utilisé en recherche et du mieux caractérisé actuellement (Baulcombe and Molnar, 2004; Voinnet et al., 1999). Les suppresseurs viraux étant connus pour augmenter la productivité des feuilles agroinfiltrées (Voinnet et al., 2003), un résultat similaire était attendu pour la coculture des cellules de plantes. Cet objectif consistait donc à démontrer la faisabilité de cette approche, qui pourrait également mener au développement d'un système de cotransformation simultanée de cellules de plante en suspension employant plusieurs constructions génétiques et souches d'*Agrobacterium*. Ces constructions pourraient améliorer la qualité et/ou la quantité des protéines d'intérêt produites en codant pour des enzymes supplémentaires telles des chaperonines ou des inhibiteurs des protéases ou en interférant avec

certaines voies métaboliques par le biais d'ARN antisens. Vézina *et al.* (2009) ont d'ailleurs rapportés la production d'anticorps avec des N-glycans similaires à ceux des humains en coexprimant dans des feuilles de tabac agroinfiltrées une  $\beta$ -1,4-galactosyltransférase humaine et chimérique alors que Kim *et al.* (2008) ont montré une hausse de la production de hGM-CSF (human granulocyte-macrophage colony stimulating factor) dans des cellules de riz en suspension coexprimant de façon stable un inhibiteur synthétique de protéinase à sérine de type II. Le développement d'un système d'expression transitoire par coculture de cellules en suspension avec plusieurs souches d'*Agrobacterium* pourraient donc permettre d'obtenir des résultats similaires tout en évitant le développement de lignées stables ou en facilitant la mise à l'échelle industrielle en comparaison avec l'agroinfiltration de feuilles.

L'objectif du second volet expérimental de cette thèse, constituant le Chapitre 5, visait l'identification et l'isolement de promoteurs forts inductibles au froid. Selon des études récentes, un stress au froid pourrait permettre l'augmentation de la quantité de protéines bioactives et correctement repliées. Tel que mentionné précédemment, ces travaux ont été initiés antérieurement aux tests de coculture et ont utilisé la lignée cellulaire NT1 en raison de sa disponibilité à l'époque. Des travaux ont donc été tentés afin de réaliser cet objectif, mais les résultats obtenus n'ont été que partiels. En effet, plusieurs fragments de gènes potentiellement inductibles au froid ont été isolés et séquencés, mais en raison des problèmes techniques rencontrés et d'un manque d'information disponible dans les banques de données sur l'espèce de *N. tabacum*, il n'a pas été possible de cloner les promoteurs associés à ces candidats. L'intérêt d'utiliser un tel stress est double puisque en plus d'améliorer la quantité et la qualité des protéines recombinantes produites s'il était combiné à la méthode de coculture développée dans le premier volet de cette thèse pourrait permettre de limiter la croissance bactérienne et de possiblement



prolonger la phase de production de cellules de plante. Malheureusement, puisque l'isolement de promoteurs inductibles n'a pu être complété, cet objectif n'a pu être atteint en entier.

## CHAPITRE 4. L'EXPRESSION D'ANTICORPS DE FAÇON TRANSITOIRE PAR DES CELLULES DE PLANTES EN SUSPENSION EST AMÉLIORÉE LORSQU'ELLES SONT COCULTIVÉES AVEC LE SUPPRESSEUR VIRAL P19

### 4.1 Présentation de l'article

Les travaux rapportés dans cet article ont été soumis (février 2010) pour publication dans la revue *Biotechnology Progress*. Dans cet article, deux approches distinctes d'expression transitoire ont été comparées pour évaluer l'impact du suppresseur viral p19 sur la production de protéines recombinantes par une culture de cellules en suspension de *N. benthamiana*. Une lignée cellulaire parentale de *N. benthamiana* a été transformée de façon transitoire soit par une lignée d'*Agrobacterium* contenant une construction codant pour une IgG1 de souris (R514), ou simultanément par deux lignées d'*Agrobacterium* contenant R514 et p19. Au meilleur de nos connaissances, il s'agit du premier cas rapporté dans la littérature de transformation double de cellules de plantes. De plus, une lignée cellulaire stable de *N. benthamiana* exprimant de façon constitutive p19 a été transformée avec l'*Agrobacterium* contenant la construction R514. La lignée parentale de *N. benthamiana* qui a été cultivée avec les deux constructions R514 et p19 a généré les plus hauts rendements d'IgG1 (1.06 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW; 0.024 % TSP) en comparaison à ceux obtenus en absence de p19 (0.61 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW; 0.014 % TSP). La lignée cellulaire de *N. benthamiana* qui avait été transformée pour exprimer constitutivement p19 a seulement atteint 0.25 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW (0.009 % TSP) lorsqu'elle a été cultivée avec l'*Agrobacterium* contenant R514. Par conséquent, nos résultats démontrent que la co-transformation transitoire de cellules de plante en suspension avec deux vecteurs de transformation est possible et que l'utilisation du

suppresseur de répression génique p19 augmente significativement la production de la protéine d'intérêt.

## **4.2. Transient expression of antibodies in suspension plant cells culture is enhanced when co-transformed with the viral suppressor of silencing p19**

### **4.2.1 Abstract**

Two distinct transient expression approaches were compared to assess the impact of the viral suppressor p19 on a recombinant protein production performed in *Nicotiana benthamiana* suspension culture. A parental *N. benthamiana* cell line was transiently transformed with either an *Agrobacterium* containing a construct encoding a murine IgG1 (R514), or concurrently with two *Agrobacteria* containing R514 or p19. To our knowledge, dual transient transformation of plant cells in culture is the first to be reported in literature. In addition, a stably transformed *N. benthamiana* cell line that constitutively expresses p19 was transformed with R514-containing *Agrobacterium*. The parental *N. benthamiana* cell line that had been co-cultivated with both p19 and R514 achieved the highest yield of IgG1 (1.06 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW; 0.024 % TSP) compared to that obtained without p19 (0.61 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW; 0.014 % TSP). The *N. benthamiana* cell line that had been stably transformed with p19 only reached 0.25 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW (0.009 % TSP) when co-cultured with R514-containing *Agrobacterium*. Therefore, our results demonstrate that transient co-transformation of plant cell suspension culture with two transformation vectors is feasible, and that the use of the viral suppressor of silencing p19 significantly raises the production of the protein of interest.

Key words: transient expression, co-culture, viral suppressor, p19, IgG1, *N. benthamiana*

#### 4.2.2 Introduction

Microbial (Jana and Deb, 2005) and animal cell (Walsh, 2005) platforms are broadly used for the production of biopharmaceuticals, which now account for over 20 % of all new pharmaceuticals on the market (Jungbauer, 2007a). However, the plant system is gaining in interest among emerging platforms because of its various advantages compared to established platforms (Shekhawat et al., 2008). Molecular farming platforms using stable genetically transformed plants or transient transformation (agroinfiltration) by modified *Agrobacteria* strains have been shown to be efficient for the production of recombinant proteins (Ma et al., 2003). The most studied plant species for recombinant protein production are tobacco (*Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana*) (Villani et al., 2008), rice (*Oryza sativa*) (Sardana et al., 2007), soybean (*Glycine max*) (**GANAPATHI ET AL., 2007**), AND TO A LESSER EXTENT TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) (**AGARWAL ET AL., 2008**). **IN VITRO CULTURE, EITHER OF PLANT CELL SUSPENSIONS** (Magnuson et al., 1998) or hairy roots (Liu et al., 2009), has also been shown to be a valuable platform for producing bioactive human proteins (Ma et al., 2003). *In vitro* plant cell culture has important advantages over other platforms such as the use of low cost and completely defined culture media (Hellwig et al., 2004) under aseptic culture conditions that do not promote human infectious agents such as viruses and prions (De Wilde et al., 2000) nor the presence of insects and microbes.

As for the other *in vitro* production platforms, stable recombinant plant cell lines can be easily obtained and master cell banks generated (Schmale et al., 2006b). Recent studies also demonstrated the potential of transient transformation of plant cells by co-cultivation with an

*Agrobacterium* strain containing an expression vector coding for a protein of interest (Andrews and Curtis, 2005; Fuentes et al., 2004). Although the proportion of transformed (i.e. productive) cells may be less than when stable recombinant cell lines are used, a transient expression approach can speed up and facilitate transformation vector screening as well as overall bioprocess management. A high reproducibility level for the bioprocess can also be achieved, avoiding possible loss of cell productive capacity by mutations or genetic rearrangement after multiple cell divisions. It may thus represent a lower risk level, in terms of cell line stability and production reproducibility, to culture a parental cell line all along the culture cascade and only start recombinant protein production at the last bioprocess step. Moreover, a transient strategy may also enable rapid response to punctual market needs, from gene identification to protein production; the development of stable recombinant eukaryote cell lines is generally time-consuming (several months) while the development of transformed *Agrobacteria* can be achieved within two weeks (Joh and VanderGheynst, 2006; Kapila et al., 1997).

Various metabolic engineering strategies were developed to increase the bioactivity and yield of a recombinant protein. Vézina *et al.* (2009) reported the production of antibodies with human-like N-glycans by transiently co-expressing in tobacco leaves a chimaeric human beta1,4-galactosyltransferase and Kim *et al.* (2008) showed an enhanced production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in stable rice cell suspensions co-expressing a synthetic serine proteinase inhibitor II (Kim et al., 2008). Higher bioproduct levels have even been observed from transient expression due to a ‘burst’ of gene expression (Gleba et al., 2007) but final recombinant protein yields are usually low, partly because of post-transcriptional gene silencing (PTGS). PTGS acts as an adaptive immune system targeted against viruses (Ratcliff et al., 1999), but it can also affect transgene expression, since, like viruses,

transgenes that are expressed under the control of a strong promoter, produce high level of identical RNAs. Interestingly, recent studies showed that PTGS limitation can be overcome using virus-encoded suppressor proteins (Voinnet et al., 2003). Many plant viruses include proteins which role is to suppress RNA silencing in the host cell (Roth et al., 2004). Various viral suppressors, such as p19 that had been identified in the *tomato bushy stunt virus* (Voinnet et al., 2003), were shown to interfere with plant cell natural defense mechanisms. Viral suppressors were thus used in an attempt to improve the yield in recombinant protein production and the most promising method relies on co-expression of viral suppressors such p19 which prevent silencing of the transgene (Voinnet et al., 2003). Therefore, an "optimized" production platform may require the simultaneous expression of many transgenes. This can either be achieved by developing a modified cell line (having all the transgenes but that for the recombinant protein of interest) which can then be transiently transformed for a recombinant protein of interest, by using a single vector allowing for the transfer of multiple genes, or by a co-transformation where multiple *Agrobacteria* strains are used simultaneously to transfer all the required transgenes. The successive transformations approach is tedious and time-consuming since multiple plant cell line regeneration and selection steps are required for each transgene addition. The successful co-transformation of plant leaves with many *Agrobacterium* strains containing different vectors has been reported with two (Plesha et al., 2007; Voinnet et al., 2003), **FOUR (LI ET AL., 2003) AND EVEN SIX DIFFERENT STRAINS** (Giritch et al., 2006) used simultaneously.

Therefore, various technological approaches are available to develop optimal transient production of a recombinant protein. In the present work, we have applied for the first time, to the best of our knowledge, the dual agroinfiltration concept to a *N. benthamiana* plant cell suspension cultured

in shake flask. Plant cells were co-cultured for 12 days with an *Agrobacterium* strain that contained the expression vector for a mouse IgG1 antibody or with two *Agrobacteria* cell lines; one containing the p19 viral suppressor and one containing the IgG1 antibody-coding genes (Heavy and Light chains). The performance of the dual agroinfection process was compared to that of transient agroinfiltration of the parental *N. benthamiana* plant and a co-culturing with an IgG1 antibody-coding *Agrobacterium* of a stable recombinant *N. benthamiana* cell line that stably expressed p19.

### **4.2.3 Experimental procedures**

#### 4.2.3.1 Plant cell line development

*N. benthamiana* leaves were sterilized by a 5 min immersion in 70% ethanol followed by a 5 min immersion in a 0.5 % hypochlorite solution. Leaves were washed in sterile water three times and cut in small disks with a scalpel blade. The disks were placed in the dark on solid MS NAA KIN medium, a variant of the MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing 30 g L<sup>-1</sup> glucose, 4 g L<sup>-1</sup> Phytigel, 2 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid and 0.05 mg L<sup>-1</sup> kinetin. Few weeks later, ~2 g of calluses were transferred into 10 mL of liquid MS NAA KIN medium in 50 mL Erlenmeyer flasks that were agitated on a rotary shaker at 120 rpm in the dark. Liquid medium was regularly added and the cells transferred to a bigger Erlenmeyer until a final 150 mL of cell suspension was obtained in 500 mL Erlenmeyer Flasks.

#### 4.2.3.2 General plant cell suspension culture

Plant cell suspensions were subcultured when the sedimented cell volume (SCV) reached 70-80 % of the total volume in 5 min (i.e. every 7 days). Subcultures were performed using a 1/3

dilution ratio (150 mL total volume) in 500 mL Erlenmeyer flasks kept at 27 °C on rotary shakers (120 rpm) in the dark. All Erlenmeyer flasks were closed with a two-layer aluminum foil.

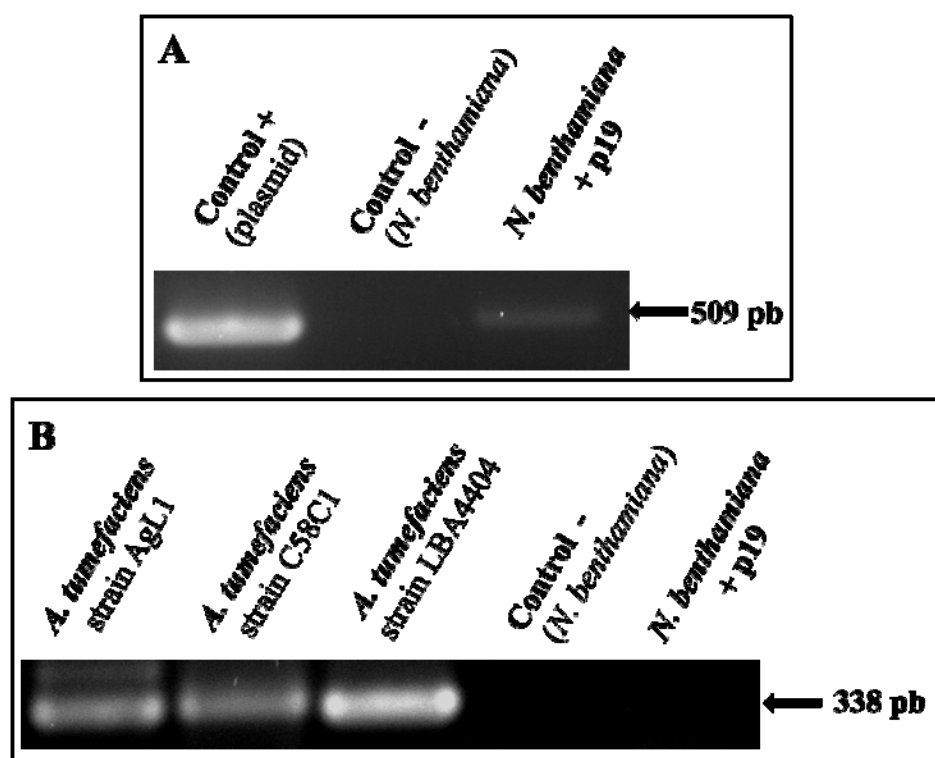
#### 4.2.3.3 Development of a stable p19 expressing *N. benthamiana* cell line

Five ml of 7 day old *N. benthamiana* cells were transferred to 10 ml of fresh MS NAA KIN medium in a 50 ml Erlenmeyer. The *Agrobacterium* strain C58C1 containing the vector coding for p19 gene was grown at 27°C overnight in LB medium supplemented with 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin. p19 was under a CaMV 35s promoter and a Nos terminator (Voinnet et al., 2003) (kindly provided by Dr. Baulcombe). The bacteria were centrifuged, and resuspended to an O.D. of 0.8 at 600 nm in MS NAA KIN. Five days after inoculation of the plant cells, 0.6 ml of fresh *Agrobacterium* suspension culture was added. Acetosyringone was also added to a final concentration of 100 µM. The cells were cultivated with the bacteria for two additional days. On day 7, the cells were collected and transferred to a 15 ml sterile tube. After centrifugation (1 min, 300 rpm), the supernatant was discarded and replaced by fresh MS NAA KIN medium with 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin and 200 mg L<sup>-1</sup> cefotaxim. Cells were mixed in the new medium for 5 min before being recentrifuged. Washing steps were repeated three times. The cells were finally plated on Petri dishes containing solid MS NAA KIN medium with 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin and 200 mg L<sup>-1</sup> cefotaxim. The Petri dishes were sealed with Parafilm™ and incubated in the dark at 27°C for 2-3 weeks. Emerging calluses were transferred on fresh Petri dishes with selective medium. Few weeks later, calluses were transferred in selective liquid medium agitated at 120 rpm. After five subculture rounds the use of antibiotics was stopped.



## 4.2.3.4 PCR analyses

Presence of p19 transgene in the stable cell line was verified by PCR analysis (Figure 4.1A). In order to ensure that the PCR fragment was related to the presence of the gene in the plant genome



**Figure 4.1.** Validation of the established *N. benthamiana* cell line expressing the viral suppressor p19. **A.** PCR assay to detect the presence of the p19 gene. **B.** PCR analysis to detect a possible residual contamination with the *Agrobacterium* used to modify the cells.

and not by a residual *Agrobacterium* contamination, PCR tests were also conducted to detect the presence of *Agrobacterium* (Figure 4.1B).

Small quantities of DNA were obtained from the suspension cells using the technique described by Edwards *et al.* (Edwards *et al.*, 1991). PCR reactions were performed in a total volume of 25  $\mu$ l (1 X GenScript PCR reaction buffer, 0.5  $\mu$ M of each primer, 200  $\mu$ M of each nucleotide), containing 1  $\mu$ l (approximately 5 ng) of DNA and 0.5 U of Taq DNA polymerase (GenScript). The PCR reactions were performed as follows: 1  $\mu$ l of DNA and 11.5  $\mu$ l of sterile water were first incubated at 94 °C for 5 min to achieve complete denaturation of genomic DNA. Subsequently, 12.5  $\mu$ l of reaction cocktail containing the other PCR components were added. Typical amplification conditions were: 35 cycles of 94°C for 20s, 50°C for 20s, and 72 ° C for 1 min, followed by a 5 min extension at 72°C. Validation of the presence of the p19 gene was performed using p19-F' (5'-ATGGAACGAGCTATACAAGGAAACG-3') and p19-R' (5'-TTACTCGCTTTCTTTTTCGAAGGTC-3') primers. Verification of a residual contamination by *Agrobacterium* was performed with the Agro-F :5'-ATGC CCGATCGAGCTCAAGT-3' and Agro-R :5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA-3' universal primers designed by Haas and coworkers (Haas *et al.*, 1995).

#### 4.2.3.5 Agroinfiltration of plants

*N. benthamiana* plants were grown in soil at 25 °C under a photoperiod of 16 h of light and 8 h darkness. One-and-a-half-month old plants were used for agroinfiltration. *Agrobacteria* were grown at 28°C overnight in LB media supplemented with 50 mg/L kanamycin. The bacteria were centrifuged, and resuspended to an O.D.<sub>600</sub> of 0.8 in a solution of 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma) and 100  $\mu$ M acetosyringone. Five different experimental conditions were tested. *N. benthamiana* plants were either left untreated, infiltrated with a solution of 10 mM MgCl<sub>2</sub>, infiltrated with an

*Agrobacterium* strain that did not contain any transformation plasmid (i.e. no T-DNA plasmid) (C58C1), infiltrated with a strain (AgL1) that contained the R514 vector (kindly provided by Medicago, Inc.) or infiltrated with both a strain that contained the R514 vector and a strain (C58C1) that contained the vector for p19. The R514 vector encoded murine IgG1 heavy and light chain genes each under a CaMV 35s promoter and Nos terminator; a variant from the R610 and R612 constructs (Vézina et al., 2009). For the combined inoculation of R514 and p19, the two bacterial suspensions were diluted at an O.D.<sub>600</sub> of 0.8 and were mixed at equal volume. A minimum of 5 plants per experimental group was transformed for this experiment. Plants were agroinfiltrated by plunging them upside down in a beaker containing 500 ml of the *Agrobacterium* suspension and placed in a bell vacuum jar. Vacuum was maintained for 30 s before being quickly released. The surfaces of the leaves were gently dried using paper tissues. The leaves that were not properly infiltrated were cut to reduce the impact of a lesser transformation. For the sampling, three leaves were taken per experimental group. The leaves were taken randomly from the different plants. The leaves were crushed in liquid nitrogen and stored at -80°C in cryovials. The whole experiment was performed twice with two distinct plant groups.

#### 4.2.3.6 Co-culture of plant cells and *Agrobacterium*

For transient expression, 30 mL of fresh MS NAA KIN medium were inoculated with 15 mL of 7 days-old plant cell cultures in 250 ml Erlenmeyer flasks. On day 5 post-inoculation, 45 ml of 2X MS NAA KIN were added to each flask. *Agrobacteria* were added 1 day after medium addition. For the *N. benthamiana* parental cell line, one group was inoculated with a strain of *Agrobacterium* (C58C1) that did not contain any transformation plasmid (i.e. no T-DNA plasmid), another one with a strain of *Agrobacterium* (AgL1) containing the R514 vector coding

for the production of the IgG1, and one group was inoculated simultaneously with two strains of *Agrobacterium*: one containing the R514 vector and one (C58C1) containing the vector coding for p19. For the *N. benthamiana* expressing p19 cell line, one group was inoculated with a strain without plasmid (C58C1) and another one with a strain (AgL1) containing the R514vector. For both plant cell lines, one group without any bacteria was also kept as control. All seven experimental groups were processed in triplicates.

*Agrobacteria* were grown at 28°C overnight in LB medium supplemented with 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin. The bacteria were centrifuged and resuspended to an O.D.<sub>600</sub> of 0.8 in MS NAA KIN. Co-cultivation was initiated in suspension cultures by inoculating 0.5 mL of the corresponding resuspended *Agrobacterium*. Acetosyringone was added to each cell flasks (including controls) to a final concentration of 100 µM. Cells were co-cultured in a dark shaker as described above. Around 15 ml of the co-cultured cells were harvested on days 0, 3, 6, 9 and 12 of co-culture. The samples were filtered (Whatman GF/D, cat # 1823047, 2.7 µm porosity) to separate cells from medium. The latter was kept at -80 C while plant cells were weighted for the fresh weight (FW) assessment, crushed in liquid nitrogen with a mortar and pestle, and store in cryovials at -80 C. The whole experiment was performed twice.

#### 4.2.3.7 Protein extraction for analysis

For cellular protein analysis, 100 mg of frozen and crushed cells were weighted in a cold 1.5 ml minitube. 50 µL of extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.00, 300 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 0.01 % (v/v) proteases inhibitor cocktail (Sigma P8849)) was then added and the mix was crushed on ice for 1 min using a small pestle for 1.5 ml minitubes. The samples were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. The supernatants were transferred to fresh minitubes and

store at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analysis. Total protein concentrations, cellular and extracellular, were measured using a BCA (bicinchonic acid) protein assay kit (Pierce, cat# 23225). All samples were diluted in water prior testing.

#### 4.2.3.8 Measurement of IgG1 by ELISA

The ELISA measurement of IgG1 was adapted from (Khouidi et al., 1999). The microplate wells (Costar 3369) were coated overnight with a goat anti-mouse IgG1 heavy chain specific antibody (Sigma M-8770) diluted at  $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer ( $50\ \text{mM}$ , pH 9.6). Blocking was achieved with 1.0 % casein-containing PBS (PBS-casein). Samples were diluted in PBS-casein solution and applied directly to the coated wells. A standard curve was prepared using an IgG1 murine standard (Sigma, M-9269). After incubation, the plates were washed and IgG1 binding was revealed using a goat anti-mouse IgG-peroxydase conjugate (Bio-Rad laboratories, CA. 170-5047). The enzyme conjugate was revealed with 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate for ELISA (Sigma, T0440). Absorbance was measured at 450 nm with a Victor<sup>3</sup>V microplate reader (PerkinElmer).

#### 4.2.3.9 Glucose concentration determination

Glucose was measured using a YSI 2700 Select Biochemistry Analyser equipped with a YSI 2365 membrane. Calibration of the instrument was performed every 6 sample measurement with a commercial standard at  $2.5\ \text{g L}^{-1}$  of glucose (RSI 27250).

#### 4.2.3.10 qPCR analysis

RNAs were extracted as follows: 1 ml of Tri-Reagent (Sigma T9424) was added to 200 mg of frozen and crushed cells in a 1.5 ml minitube and vortexed for 1min. After 5 min incubation

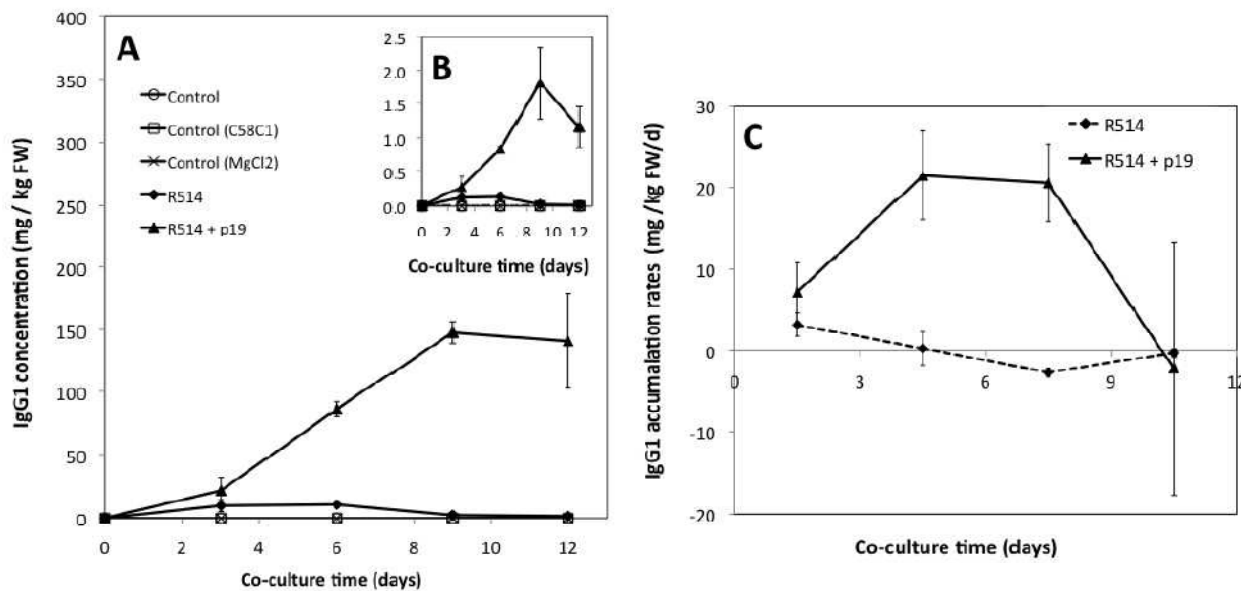
(room temperature), 0.2 ml of chloroform was added and mixed. After 15 min incubation (room temperature), the samples were centrifuged (4 °C, 15 min, 12 000 g). The supernatants were transferred to fresh minitubes and followed by 0.5 ml isopropanol addition. The samples were incubated for 10 min at room temperature before centrifugation (4 °C, 10 min, 12 000g). The supernatants were discarded, the pellets washed with 1 ml EtOH 70% and centrifuged (4 °C, 5 min, 7 500 g). The supernatants were discarded and the pellets were air-dried for 10 min at room temperature, resuspended in 50 µl DEPC-treated water and stored at -80°C until use. RNA quantification by reverse transcription and qPCR analysis was performed by the Genomics Core Facility at IRIC (Montréal, Qc). 2 µg of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 20 µL using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. Gene expression level was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). This technology utilizes short hydrolysis probes of 8 or 9 bases. Using Locked Nucleic Acid (LNA) nucleotide chemistry, these short probes retained high melting temperature characteristic of normally observed for longer probes. Because probes are only 8 or 9 bases long, each probe can statistically hybridize to over 7,000 transcripts; thus, a set of 100 probes only can enable the quantification of virtually any transcript in a transcriptome. The primers used for this analysis are as follow: IgG1 (UPL # 71) Forward 5'- TACTGTGGAGTGGCAGTGGA-3', Reverse 5'- TGATGGGCTGAGTGTTCTTG-3' p19 (UPL # 7) Forward 5'- GTTGGGATGGAGGATCAGG-3' Reverse 5'- CTCGGACTTTCGTCAGGAAG-3' Actin (UPL # 67) Forward 5'- TGGAACAGGAATGGTCAAGG-3' Reverse 5'- AGGGAATACAGCTCGTGGAG-3', Ubiquitin (UPL # 39) Forward 5'- TGACTGGGAAGACCATCACC-3' Reverse 5'- CCTTGTCTGGATCTTAGCTTTT-3'. PCR reactions were performed in 384 well plate formats using 2 µl of cDNA sample (25 ng), 5 µl of

the Fast Universal qPCR MasterMix (Applied Biosystems), 2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ M of a UPL probe in a total volume of 10  $\mu$ l. The ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed as follows: an initial step of 3 min at 95°C was followed by 45 cycles of : 5 s at 95°C and 30 s at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average Cts values were used for quantification. The actin and ubiquitin genes were used as endogenous controls. The relative quantification of target genes was determined using the  $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene (Ubiquitin) ( $\Delta$ CT = Ct<sub>target</sub> - Ct<sub>Ubiquitin</sub>) and compared with a calibrator:  $\Delta\Delta$ CT =  $\Delta$ Ct<sub>Sample</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>Calibrator</sub>. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) based on the formula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 4.2.4 Results and Discussion

**4.2.4.1 Dual agroinfiltration of *N. benthamiana* plants with both p19- and IgG1-containing *A. tumefaciens* bacterial strains significantly enhances IgG1 production in leaves**

In order to evaluate the transformation efficiency of the two *A. tumefaciens* cell lines (IgG1 and p19), both were tested on wild-type *N. benthamiana* plants by agroinfiltration technique (Simmons et al., 2009). Maximum yields in IgG1 were obtained for the simultaneous infiltration of R514- and p19- containing *A. tumefaciens* (Figures. 4.2A and B). On day 9, IgG1 concentration in the leaves reached a maximum value of 147.7 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW. This corresponded to 1.80 % TSP. This yield in IgG1 was almost 14 times higher than the maximum yield obtained on day 6 without p19 (10.8 mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW; 0.13 % TSP). IgG1 accumulation



**Figure 4.2 Concentration and accumulation rate of cellular IgG1 in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves:** **A.** Concentration (mg IgG1 kg<sup>-1</sup>) FW, **B.** Concentration (% TSP) and **C.** Accumulation rate (mg IgG1 kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Control: plant leaves that had not been infiltrated; Control (C58C1): plant leaves infiltrated with the *Agrobacterium* C58C1 strain that did not contain a Ti-plasmid; Control (MgCl<sub>2</sub>): plant leaves infiltrated with a 10 mM MgCl<sub>2</sub> solution only. Control R514: plant leaves infiltrated with the *Agrobacterium* AgL1 strain containing the R514 vector for IgG1 production; R514 + p19: plant leaves infiltrated with *Agrobacterium* AgL1 strain containing the R514 vector for IgG1 production and *Agrobacterium* C58C1 strain containing the vector for the p19 viral suppressor.

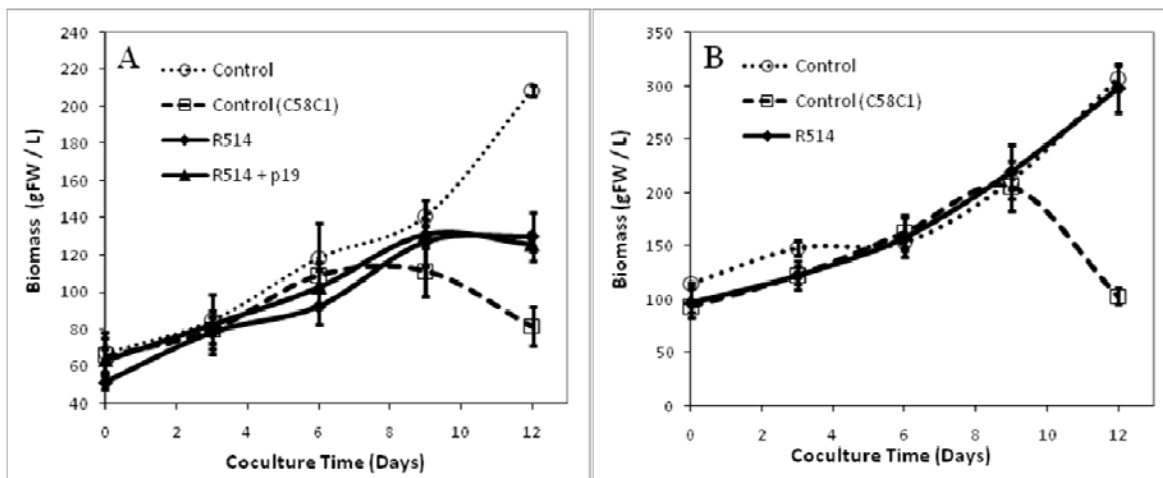


rates were calculated between each sampling times in order to compare the productivity levels (Figure. 4.2C). The antibody accumulated during the first three days at a rate of  $3.26 \pm 1.51$  (SEM)  $\text{mg IgG1 kg}^{-1} \text{FW d}^{-1}$  for R514 only transformation ( $r^2=0.70$ ;  $n=4$  data points), and its concentration stabilized from day 3 to 6. From day 6, the IgG1 concentration decreased to reach undetectable level at day 9. In the case of the dual agroinfiltration procedure (i.e., R514- and p19-containing *Agrobacteria*), the antibody accumulated at a constant rate of  $21.00 \pm 1.74$   $\text{mg IgG1 kg}^{-1} \text{FW d}^{-1}$  ( $r^2=0.97$ ;  $n=6$ ) between day 3 and 9 and decreased thereafter (Figure 4.2C). These results unambiguously demonstrated that the R514 and the p19 *A. tumefaciens* bacterial strains were effective and that the addition of p19 both increased and prolonged recombinant protein production, in accordance with previous reported results (Voinnet et al., 2003).

#### 4.2.4.2 Effects of co-cultivating *N. benthamiana* suspension cells with *A. tumefaciens*

##### *Plant cell growth*

Two common *Agrobacteria* strains (AgL1 for R514 and C58C1 for p19) were used to assess the impact of co-culture with *N. benthamiana* suspension cells. During the first week of co-cultivation (R514 or the combined R514 and p19 *A. tumefaciens* strains), plant cells growth was not significantly affected by the presence of the *Agrobacteria* strain(s) (Figure 4.3A and B), with average specific growth rates of  $0.089 \pm 0.0061 \text{ d}^{-1}$  ( $r^2=0.82$ ,  $n=49$ ) and  $0.085 \pm 0.0057 \text{ d}^{-1}$  ( $r^2=0.87$ ,  $n=34$ ) for the parental and the stable p19 *N. benthamiana* plant cell lines, respectively (the contribution of the presence of the *Agrobacteria* to the measured biomass was considered negligible). Thus, during the first week of culture, no significant differences could be observed between a wild-type cell line and a cell line that had been transformed to constitutively express p19. However, on day 12, cultures corresponding to *N. benthamiana* parental cell line (Figure 4.3A) exposed to R514 and to the dual R514/p19 showed a lower final biomass when compared



**Figure 4.3 Growth of *N. benthamiana* suspension cells co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens*:** **A.** *N. benthamiana* parental cell line, **B.** *N. benthamiana* cell line transformed to constitutively express the p19 viral suppressor. Control: plant cells grown without bacteria; Control (C58C1): plant cells grown with *Agrobacterium* C58C1 that did not contain T-plasmid; R514: plant cells grown with *Agrobacterium* AgL1 that contained the R514 vector for IgG1 production; R514 + p19: plant cells grown with *Agrobacterium* AgL1 that contained the R514 vector for IgG1 production and *Agrobacterium* C58C1 that contained the vector for the p19 viral suppressor.

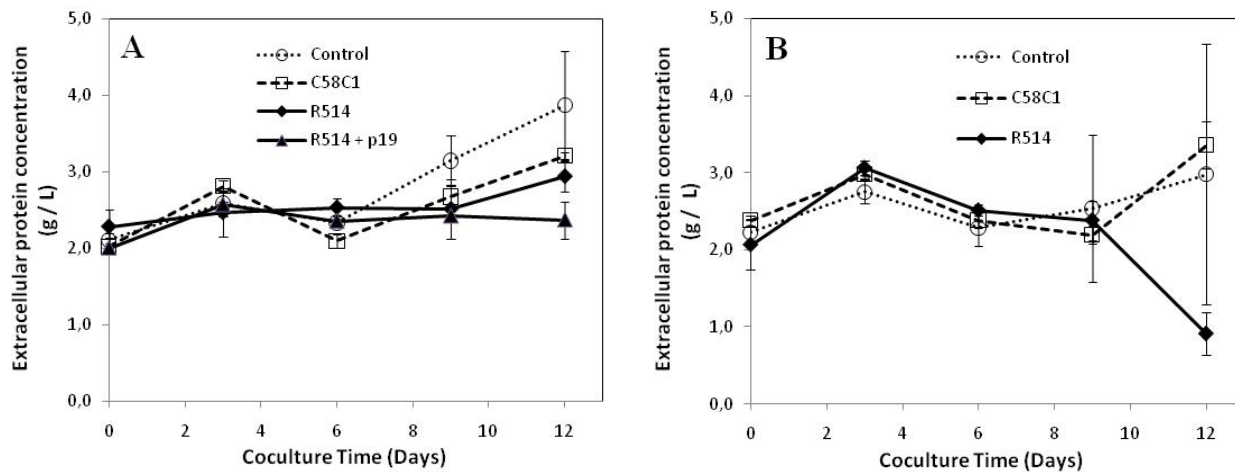
to control. The co-culture of the parental *N. benthamiana* with a T-DNA plasmid-free *Agrobacterium* (C58C1) (control-C58C1 culture) resulted in an even more pronounced decrease in biomass concentration at day 12. The co-culture of the stable p19 *N. benthamiana* cell line with T-plasmid free *Agrobacterium* (C58C1) showed a similar reduction of biomass on day 12 (Figure 4.3B) but, surprisingly, co-cultivation with *Agrobacterium* R514 did not seem to affect plant cells growth for the 12 day culture duration (Figure 4.3B). The high cell death observed in all flasks containing the T-DNA plasmid-free *Agrobacterium* (C58C1) could be partly attributed to a more rapid bacterial growth due to the absence of metabolic burden caused by the T-DNA plasmid. These results indicated that, in most cases, long-term co-cultivation of plant cells with *Agrobacteria* can be detrimental to the cells. In fact, many of the flasks containing *Agrobacteria* turned brown or black by day 12 as opposed to a light yellow color for control cultures (no bacteria), hence suggesting a large-scale hypersensitive cell death response as observed during an incompatible plant-pathogen interaction (Atkinson et al., 1985). However, the presence of *Agrobacteria* did not significantly affect glucose consumption (a decrease similar to control culture was observed). Interestingly, glucose concentration in the culture media was not limiting in any cultures. That is, residual concentration above 5 g L<sup>-1</sup> glucose were measured for all cultures (data not shown), while limiting glucose concentration had been evaluated to ~ 1 g L<sup>-1</sup> (Cloutier et al., 2008).

#### *Total protein production*

In our experiments, intra-membrane and intra-cell wall proteins could not be distinguished. Consequently, they were both included under the term “cellular” proteins. On the other hand, the extracellular proteins include the ones found in the extracellular medium. Total extracellular protein concentration followed a similar trend in all cell cultures, with a rapid increase from day 0

to day 3 before returning to its initial level on day 6 (Figure 4.4A and B). Then, the extracellular protein concentration increased in all control cultures from day 9 and 12, and to a lower extent for the co-culture of the parental *N. benthamiana* with R514. The behavior differed in the presence of p19, with a total protein concentration remaining constant for the co-culture corresponding to R514 and p19 *Agrobacteria* dual agroinfiltration, and strongly decreasing for the co-culture corresponding to R514 and transgenic-p19 *N. benthamiana* cell line. However, no clear relationship between the respective behaviors of the extracellular protein concentrations and the biomass had been observed. For instance, in the parental *N. benthamiana* cell line, the biomass content was stable for the co-culture with R514 and that with R514 and p19 (Figure 4.3A), while the total extracellular protein concentration slightly increased in the co-culture with R514 and stayed more or less stable for the co-culture involving R514 and p19 (Figure 4.4A). For the control culture, total protein concentration increased with a concomitant biomass increase, while in the C58C1 control, total protein concentration increased concurrently with a decrease in biomass.

For *N. benthamiana* cell cultures that constitutively expressed p19, the C58C1 control co-culture showed an increase in extracellular protein concentration (Figure 4.4B) while its biomass decreased (Figure 4.3B). For the control culture (without any co-culture with *Agrobacteria*), both the extracellular protein concentration and the biomass increased. However, the R514 co-culture ended with a decrease of extracellular protein concentration and an increase of biomass (Compare Figures 4.4B and 4.3B). It is clear from cell browning that, for the C58C1 control, co-cultures led to cell death (Atkinson et al., 1985), which resulted in an increase in protein concentration in the culture medium. In the case of control cultures, sustained plant cell growth seemed to result in a steady and sustained release of proteins. Interestingly, all co-cultures involving both R514 and

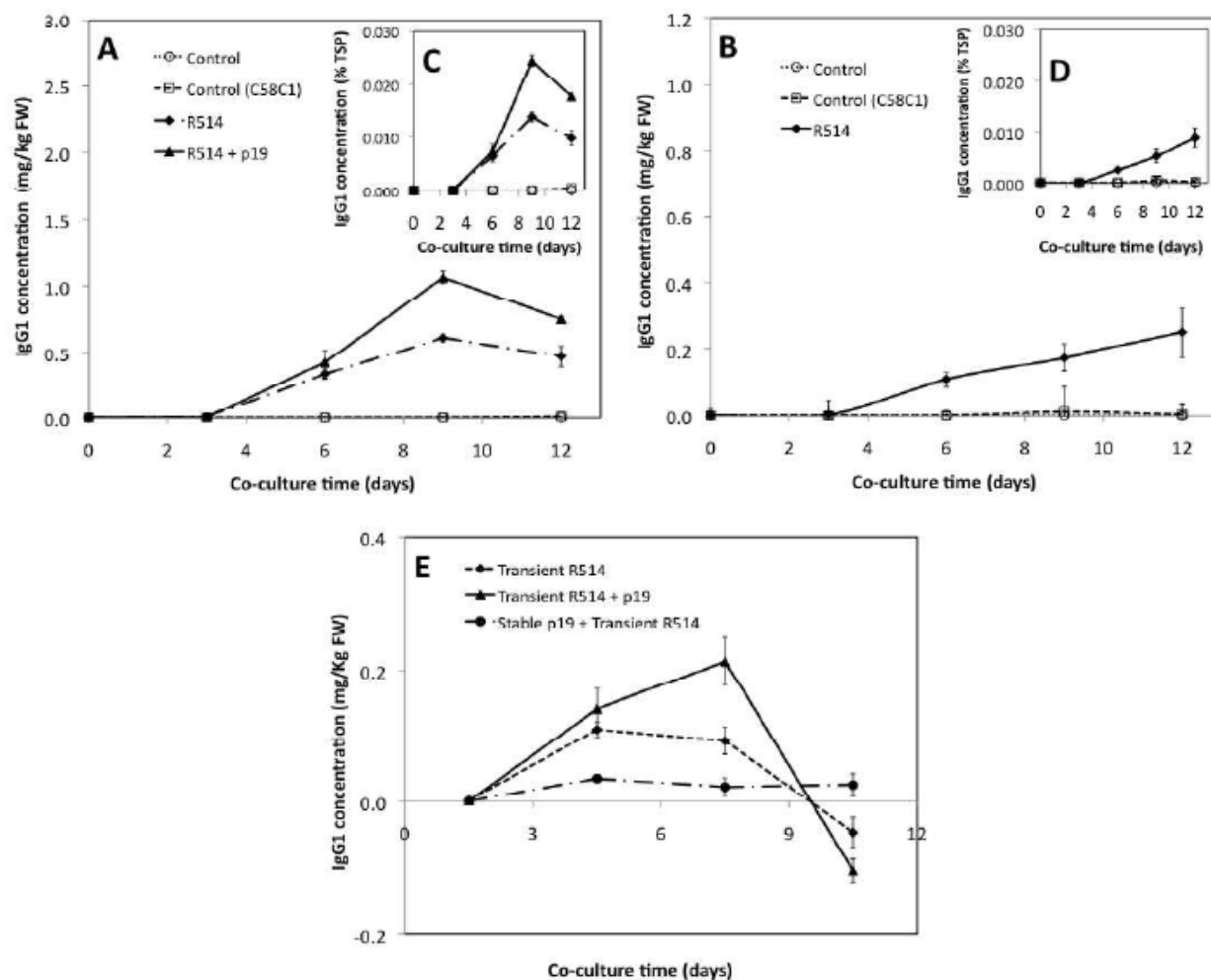


**Figure 4.4** Concentration of total extracellular protein in culture media for *N. benthamiana* suspension cells co-cultured with *A. tumefaciens*: **A.** *N. benthamiana* parental cell line, **B** *N. benthamiana* cell line transformed to express the viral suppressor p19 constitutively. Data series are as described for Figure 4.3.

p19 resulted in a decrease or a stabilization of the extracellular protein concentration. In the case of the cell content in soluble proteins, the control cultures showed constant values of  $6.87 \pm 0.44$  and  $4.97 \pm 0.30$  g proteins kg FW<sup>-1</sup> for the first 6 days, in the parental and the transgenic p19 *N. benthamiana* cell lines, respectively. A constant decrease was then observed in all cultures, a tendency that was initiated from day 6 in the cultures involving R514. Overall, these results suggested that the viral p19 protein modified plant cell metabolism in such a way that the global protein content was produced at a lower rate. Further work would be required to strengthen this hypothesis.

#### 4.2.4.3 IgG1 accumulates in plant cells in cultures

Cellular IgG1 was monitored in all cell cultures and was undetectable until day 6 (Figure 4.5). The antibody was not detected at day 3 but the trend, with time, for the IgG1 cellular concentration suggests that the antibody production in all co-cultures was only above the detection limit of our ELISA protocol after around 3 days of co-culture. The co-cultures of the parental *N. benthamiana* cell line with R514 yielded  $0.610 \pm 0.028$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW (0.014 %TSP) on day 9 (Figures 4.5A and C). In that culture, the cell specific productivity in IgG1 reached a plateau between day 3 and day 9, with  $0.100 \pm 0.005$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW d<sup>-1</sup> ( $r^2=0.98$ ,  $n=9$ ), and decreased thereafter (Figure 4.5E). Co-cultivating *N. benthamiana* parental cell line with the two *Agrobacteria* strains corresponding to R514 and p19 had a strong impact on IgG1 production with a maximum cell content of  $1.064 \pm 0.045$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW (0,024 % TSP) (Figure 4.5A), the equivalent of a 75 % increase, which was also reached on day 9. In that R514/p19 co-culture with the parental *N. benthamiana* cell line, the specific productivity in IgG1 increased linearly from day 3 and reached a maximum between day 6 and day 9 with  $0.213 \pm 0.036$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW d<sup>-1</sup> (Figure 4.5E). This corresponded to a two-fold increased when



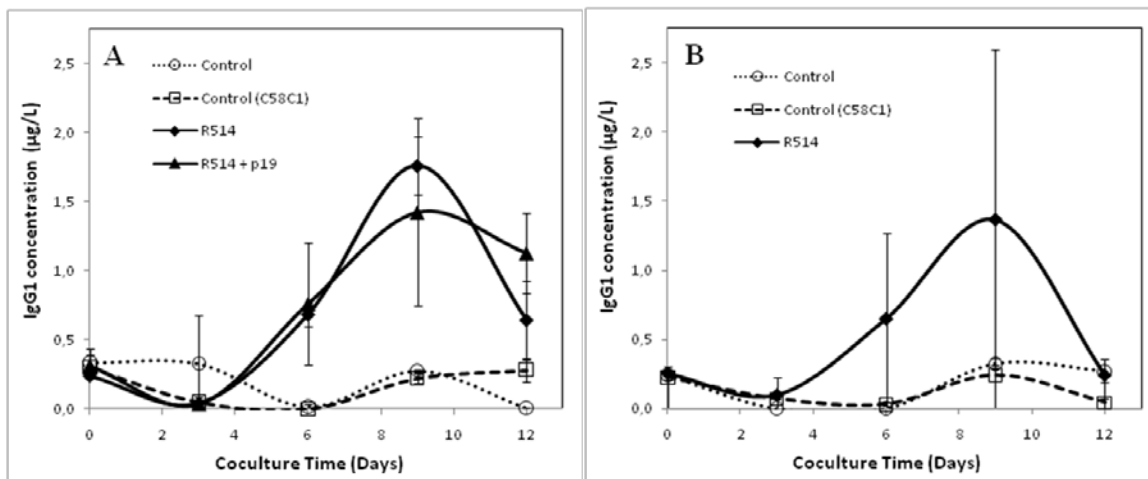
**Figure 4.5.** Concentration and accumulation rate of cellular IgG1 for *N. benthamiana* suspension cells co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens*: **A** Concentration (mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW) *N. benthamiana* parental cell line, **B** Concentration (mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW) *N. benthamiana* cell line transformed to express the viral suppressor p19 constitutively. **C.** Concentration (% TSP) *N. benthamiana* parental cell line, **D.** Concentration (% TSP) *N. benthamiana* cell line transformed to express the viral suppressor p19 constitutively, and **E.** Accumulation rate for both plant cell lines (mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW d<sup>-1</sup>). Data series are as described for Figure 4.3.

compared to that related to the co-culture with R514 only (Figure 4.5E). In the R514 co-culture with the p19 *N. benthamiana* cell line antibody accumulation continuously increased and reached  $0.25 \pm 0.075$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW on day 12 (Figure 4.5B). The specific productivity in the p19 line IgG1 oscillated from  $0.022 \pm 0.013$  to  $0.035 \pm 0.07$  mg IgG1 kg<sup>-1</sup> FW d<sup>-1</sup> between day 3 and day 12 (Figure 4.5E), a range of values that were 6 to 9 fold lower than those for the dual co-culture with R514 and p19. Interestingly, the antibody cell content increased from day 3 to day 6 at faster specific rates than for plant cell growth with  $1.28 \pm 0.079$  d<sup>-1</sup> ( $r^2=0.99$ ,  $n=6$ ),  $1.58 \pm 0.097$  d<sup>-1</sup> ( $r^2=0.99$ ,  $n=6$ ) and  $1.16 \pm 0.087$  d<sup>-1</sup> ( $r^2=0.98$ ,  $n=6$ ) for the co-culture with R514, dual R514/p19 and with R514 and the p19 *N. benthamiana* cell line, respectively. Therefore, the specific rate of increase of the IgG1 cell content was higher when simultaneously co-cultivating with R514 and p19 (compare to the single use of R514). Then, from day 9, the cellular concentration of IgG1 decreased in the culture with the parental *N. benthamiana* cell line, concurrently with plant cell growth arrest (Figure 4.3A).

IgG1 secretion into the extracellular medium was clearly not favored and low concentrations of  $1.76 \pm 0.21$ ,  $1.42 \pm 0.68$  and  $1.36 \pm 1.23$  µg L<sup>-1</sup> were measured at day 9, respectively for the R514, the dual R514 / p19 and the R514 with the p19 expressing cell line (Fig. 4.6A and B).

These low concentrations disabled sample dilution for ELISA analysis and resulted in increased measurement errors. The R514 genetic construction was designed to direct the antibody towards the secretory pathway. However, due to its large size (~ 150 kD), the IgG1 may have been trapped by the cell wall. Nevertheless, the observed trends are similar to those of cellular concentrations. Also, the specific rate of increase was similar for the three cultures involving IgG1 production with  $0.19 \pm 0.014$  d<sup>-1</sup> ( $r^2=0.96$ ,  $n=9$ ). This specific rate was 2 fold





**Figure 4.6** Concentration of extracellular IgG1 for *Nicotiana benthamiana* suspension cells co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens*: **A** *N. benthamiana* parental cell line, **B** *N. benthamiana* cell line transformed to express constitutively the viral suppressor p19. Data series are as described for Figure 4.3.

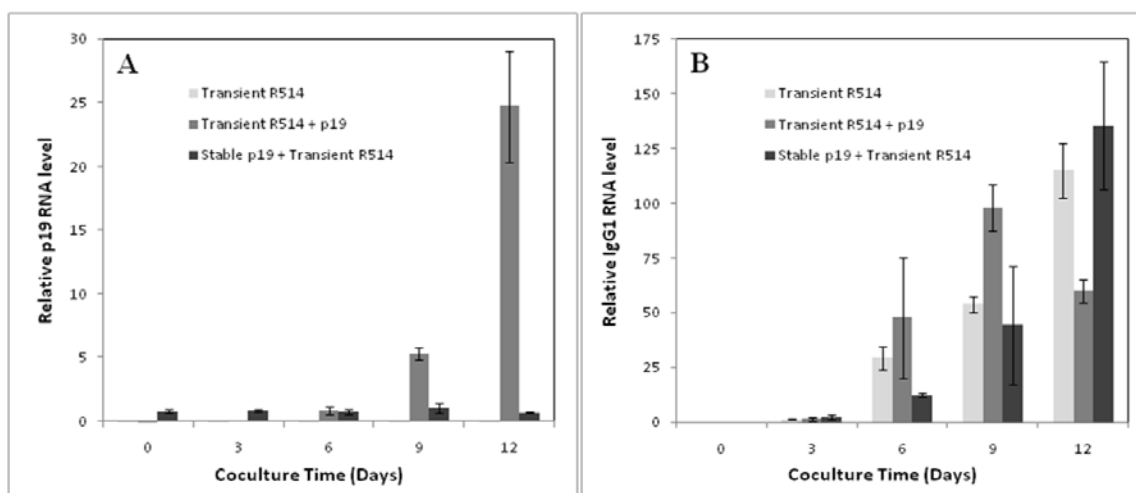
higher than that corresponding to cell specific growth rate, which may in turn suggest that the presence of the antibody in the medium was not only related to a cell division process where IgG1 is released from entrapment in the cell wall or cell lysis from death. On day 12, extracellular IgG1 levels decreased, more likely due to protease release in the medium from dying cells.

The p19 silencing suppressor is known to interfere with the plant mechanism responsible for the destruction of viral RNA and for the production of small interfering RNAs (siRNAs) involved in plant developmental pathways (Chuck et al., 2009) and other mechanisms such as stress response or environmental changes (Bonnet et al., 2006). In our case, p19 had no significant effect on plant cell growth rate, when either expressed in a transient or stable fashion. However, a significantly lower cell content in total soluble proteins (1.38 fold) was observed for the stable p19 transgenic *N. benthamiana* cell line when compared to the parental cell line. The significant differences observed between the IgG1 specific yield and productivity for the parental and the p19 expressing *N. benthamiana* cell lines may be explained from differences in the availability of the p19 proteins within the cells. Indeed, p19 crystal structure showed that a homodimer of this viral suppressor can easily enclose and capture a 21-nt siRNA, thus preventing their interaction with the viral or transgene RNA and thus, their silencing (Baulcombe and Molnar, 2004). Due to its mechanism of action, p19 must be expressed at high levels within the cells in order to interfere with siRNAs (Canto et al., 2006; Qiu et al., 2002). It is now acknowledged that recombinant protein levels are usually higher for transient expression than for non-selected stable cell lines due to a “burst” of expression occurring few days after infection in the transient mode (Collens et al., 2007). A common hypothesis for this phenomenon is that, during the first days of infection, many non-integrated copies of the T-DNA reach the nucleus and are transcribed (Narasimhulu et al., 1996). In order to validate this hypothesis, a qPCR analysis of the p19 RNA level was

performed on the *N. benthamiana* cell line that had been transiently transformed with p19 and on the p19 expressing *N. benthamiana* stable cell line (Figure 4.7A).

As expected, the level of expression of p19 in the stable cell line remained almost constant over the 12 days of co-culture. This result for p19 stable cell line was then used as a reference to compare with the transient p19 transformation. In the dual transformation co-culture, higher levels of p19-RNA were indeed observed, reaching almost 25 times the level of the stable p19 *N. benthamiana* cell line on day 12. This can be explained by the fact that over time, more and more plant cells are transformed. Note that all our samples were standardized using ubiquitin as an expression reference. This means that levels obtained for the dual transformation are in fact much higher than what is shown in Figure 4.7A. For example, on day 3, if only 1% of the cells are transformed, the p19 RNAs they produce are diluted among 99% of non-transformed cells. Since it is impossible, under our experimental conditions, to know the exact percentage of transformed cells due to the absence of a specific marker (i.e, GUS, GFP, etc..), it is only possible to conclude that the expression level of p19 was significantly higher for the transiently transformed cells than for the stable cell line after 9 days and longer.

The co-infection approach thus seems more effective while it interferes with the silencing mechanism and result in higher yields than when using a stable p19 expressing cell line. To complete this study, IgG1 accumulation was followed in the *N. benthamiana* parental cell line transiently transformed with the R514 construct only or with both R514 and p19, and in the p19 expressing *N. benthamiana* cell line transformed with R514 (Figure 4.7B). When compared to the IgG1 protein levels shown in Figure 4.5, it appears that the RNA levels evolved similarly for the



**Figure 4.7** *N. benthamiana* suspension cells co-cultured with *A. tumefaciens*: **A** Relative p19 RNA level, **B** Relative IgG1 RNA level. Same conditions as Figure 4.3 applied.

parental cell line from day 0 to 9. On day 3, a detectable RNA level was observed in all experimental groups, but IgG1 levels were still close to the detection limit of the ELISA assay. On day 6, IgG1-RNAs levels for the two groups with the parental cell line were similar, which is also reflected by similar IgG1 levels (Figure 4.5A). The presence of the viral suppressor p19 on day 9 has almost doubled the RNA level in dual transformation group and the IgG1 quantity observed in the cells with p19 has also exhibited a ~2-fold increase. The RNA protection from PTGS effect of p19 has thus resulted in higher RNA levels. The p19 *N. benthamiana* expressing cell line that had been transformed with R514 showed a similar trend in its IgG1-RNA levels as the R514 transformed parental cell line showing that the presence of low levels of p19 had few effects on IgG1-RNAs. However, on day 12, the parental cell line with R514 (only) showed an increase of RNA level but a reduction of the cells IgG1 level. Furthermore, for the group with both p19 and R514, even with the highest level of p19, a significant reduction of RNAs was observed. These results may be explained by plant cell death that has been observed in all co-cultures from day 12.

#### **4.2.4.4 Approaches to improve co-culture productivity in recombinant protein**

It is clear from this study that the *in vitro* co-culture approach needs to be improved in order to reach the production level observed for whole plant agroinfiltration. Nonetheless, our results showed that a transient dual transformation of suspension plant cells is feasible and was more efficient than transiently re-transforming an established modified cell line. Besides being fast and flexible, an entirely transient expression system has thus led to higher yields in antibody. To raise the yield in a recombinant protein, transformation vectors (the cassette, promoters, etc.) can be improved in order to be better adapted to the suspension plant cell culture conditions. One could think that encoding the viral suppressor p19 on the same T-DNA than the IgG1 heavy and light

genes may result in higher yields due to the presence of the suppressor in all the producing cells. The use of such efficient multigene vectors has been recently reported in agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves (Sainsbury et al., 2009). In order to maintain a vector size under 10 kb, which is preferable to improve yields during cloning procedure and facilitate construction development, Sainsbury *et al.* (2009) successfully removed more than half of the plasmid backbone and some of the T-DNA region without compromising transient expression levels. This study utilizing the viral suppressor p19 encoded within the same T-DNA as the gene of interest had expression levels at least as high as those obtained with the use of multiple *Agrobacteria* lines (Sainsbury et al., 2009). Furthermore, for the multigene vectors, similar yields could be achieved with *Agrobacteria* concentrations half the ones used in coculture

The advantage of a co-culture suspension versus an agroinfiltration process is the significant reduction of the required inocula size due to the fact that *Agrobacteria* cells will grow and thus continuously contribute to transform growing plant cells, which is not possible in plant leaves due to the limited nutrients in the intercellular space. However, our capacity to control the growth of *Agrobacterium* without affecting the continuous transformation of the plant cells is of prime importance to prolong the production phase with viable, growing and producing plant cells. Andrews and Curtis (2005) proposed the use of an auxotrophic *Agrobacterium* strain which growth was successfully controlled by the presence (growth) or absence (non-growth) of cysteine in culture medium. They were thus able to control the development of the bacteria for 3 to 5 days, a time period, however, for which we have not noticed any significant negative effect on plant cells in our experiments. In addition to the use of an auxotrophic *Agrobacterium*, or as an alternative, the use of a bioreactor allowing for continuous fresh medium perfusion (De Dobbeleer et al., 2006b; Su and Arias, 2003; Su et al., 1996) enabling continuous bacterial cells

washout may be highly efficient to control *Agrobacteria* populations.

#### 4.2.5 Conclusion

In this study, we showed that a dual transient *Agrobacterium*-mediated transformation process of suspension plant cells, using a viral suppressor such as p19 in combination to an expression vector increases recombinant protein production by 2 fold when compared to that for the use of the expression vector alone. The continuous presence of *Agrobacteria* had no significant negative effects in terms of cell growth and extracellular protein production for the first 6 days of co-culture. However, plant cells in contact with the bacteria started to die thereafter and caused a decrease of cellular IgG1 concentration. We showed that, in our specific case, we were able to reach higher yields by co-cultivating plants cells with two *Agrobacteria* strains bearing the gene of interest and the p19 silencing suppressor, respectively. qPCR analyses showed that p19 expression level in this group were much higher than for cell line that was stably transformed with p19. This may, in part, explain the higher level of IgG1 produced due to the interference of p19 with PTGS. The p19 expressing *N. benthamiana* cell line showed lower yields more likely due to a negative effect of p19 on the plant cell mechanisms or to a expression level of p19 being lower than in the transient system. Extracellular levels of IgG1 remained low for all our groups, as it may be trap by the cell wall. However, it indicates low cell death during the bioprocess.

#### **4.2.6 Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr. Marc-André D'Aoust from Medicago Inc. (Quebec, Canada) for kindly providing the IgG1 expression vector (R514) and Dr. David Baulcombe from the John Innes Centre (Norwich, UK) for providing the p19 construct. This work was supported by the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (MJ), Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (GDC) and the Canada Research Chair in Functional Genomics and Plant Signal Transduction (DPM). Eric B. Boivin held a Ph. D. scholarship from the FQRNT.



#### 4.2.7 References

- Agarwal S, Singh R, Sanyal I, Amla DV. 2008. Expression of modified gene encoding functional human  $\alpha$ -1-antitrypsin protein in transgenic tomato plants. *Transgenic Research* 17(5):881-896.
- Andrews LB, Curtis WR. 2005. Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnology Progress* 21:946-952.
- Atkinson MM, Huang J-S, Knopp JA. 1985. Hypersensitivity of suspension-cultured tobacco cells to pathogenic bacteria. *Phytopathology* 75(11):1270-1274.
- Baulcombe DC, Molnar A. 2004. Crystal Structure of p19 - A Universal Suppressor of RNA Silencing. *TRENDS in Biochemical Science* 29:279-281.
- Bonnet E, Van de Peer Y, Rouzé P. 2006. The small RNA world of plants. *New Phytologist* 171(3):451-468.
- Canto T, Uhrig JF, Swanson M, Wright KM, MacFarlane SA. 2006. Translocation of *Tomato bushy stunt virus* p19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its suppressor activity. *Journal of Virology* 80(18):9064-9072.
- Chuck G, Candela H, Hake S. 2009. Big impact by small RNAs in plant development. *Current opinion in Plant Biology* 12(1):81-86.
- Collens JI, Mason HS, Curtis WR. 2007. *Agrobacterium*-mediated viral vector-amplified transient gene expression in *Nicotiana glutinosa* plant tissue culture. *Biotechnology Progress* 23(3):570-576.
- De Dobbeleer C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R, Jolicoeur M. 2006. A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Biotechnology and Bioengineering* 95(6):1126-1137.

- De Wilde C, Van Houdt H, De Buck S, Angenon G, De Jager G, Depicker A. 2000. Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of the transgene silencing. *Plant Molecular Biology* 43:347-359.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6):1349.
- Fuentes A, Ramos PL, Meilyn Rodriguez CA, Ramirez N, Pujol M. 2004. Development of a highly efficient system for assessing recombinant gene expression in plant cell suspensions via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39:355-361.
- Ganapathi TR, Sunil Kumar GB, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA. 2007. Analysis of the limitations of hepatitis B surface antigen expression in soybean cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 26(9):1575-1584.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with non competing viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(40):14701-14706.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current opinion in Biotechnology* 18(2):134-141.
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8):2879-2884.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* 22(11):1415-1422.
- Jana S, Deb JK. 2005. Strategies for Efficient Production of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:289-298.

- Joh LD, VanderGheynst JS. 2006. Agroinfiltration of plant tissues for production of high-value recombinant proteins: an alternative to production in transgenic crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13):2002-2004.
- Jungbauer A. 2007. Editorial: Biopharmaceutical Technologies. *Biotechnology Journal* 2:647.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122:101-108.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, Vézina L-P. 1999. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering* 64(2):135-143.
- Kim T-G, Lee H-J, Jang Y-S, Shin T-H, Yang M-S. 2008. Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture. *Protein Expression and Purification* 61(2):117-121.
- Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, Chiang VL. 2003. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(8):4939-4944.
- Liu C, Towler MJ, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. 2009. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(4):1074-86.
- Ma J, Drake P, Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 4:794-805.
- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, Hayglass K, Lee JM. 1998. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expression and Purification* 13(1):45-52.

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Narasimhulu SB, Deng X-B, Sarria R, Gelvin SB. 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA Genes in Tobacco and Maize. *The Plant Cell* 8:873-886.
- Plesha MA, Huang T-K, Dandekar AM, Falk BW, McDonald KA. 2007. High-Level transient production of a heterologous protein in plants by optimizing induction of a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnology Progress* 23:1277-1285.
- Qiu W, Park J-W, Scholthof HB. 2002. Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage feature that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(3):269-280.
- Ratcliff F, MacFarlane S, Baulcombe D. 1999. Gene silencing without DNA:RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell* 14:689-702.
- Roth B, Pruss G, Vance V. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 102:97-108.
- Sainsbury F, Lomonosoff GP. 2008. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiology* 148:1212-1218.
- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonosoff GP. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* (In Press).
- Sardana R, Dudani AK, Tackaberry E, Alli Z, Porter S, Rowlandson K, Ganz P, Altosaar I. 2007. Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants. *Transgenic Research* 16(6):713-721.
- Schmale K, Rademacher T, Fischer R, Hellwig S. 2006. Towards industrial usefulness - cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *Journal of Biotechnology* 124(1):302-311.

- Shekhawat UKS, Ganapathi TR, Srinivas L, Bapat VA, Rathore TS. 2008. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic cell suspension cultures of *Santalum album* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92(3):261-271.
- Simmons CW, VanderGheynst JS, Upadhyaya S. 2009. A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent *in planta* transgene transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* 102(3):965-970.
- Su WW, Arias R. 2003. Continuous Plant Cell Perfusion Culture: Bioreactor Characterization and Secreted Enzyme Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(1):13-20.
- Su WW, He BJ, Liang H, Sun S. 1996. A Perfusion Air-Lift Bioreactor for High Density Plant Cell Cultivation and Secreted protein Production. *Journal of Biotechnology* 50:225-233.
- Vézina L-P, Faye L, Lerouge P, D'Aoust M-A, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie P-O, Bardor M, Gomord V. 2009. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like *N-glycans* in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7:442-455.
- Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E, Donini M. 2008. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal* 7(1):59-72.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* 33:949-956.
- Walsh G. 2005. Biopharmaceuticals: Recent Approvals and likely Directions. *TRENDS in Biotechnology* 23(11):553-558.

## **CHAPITRE 5 : ISOLEMENT DE PROMOTEURS FORTS INDUCTIBLES AU FROID CHEZ NICOTIANA TABACUM**

### **5.1. Introduction**

Lorsque l'on tente de produire des protéines à grande échelle à l'aide de plateformes *in vitro* (bactéries, levure, cellules mammifères, plantes et cellules de plantes), l'objectif principal est d'obtenir une productivité maximale pour une bioactivité maximale. Comme il a été mentionné à la section 2.2.3.1.3, l'utilisation d'un promoteur fort permet de compenser pour une instabilité des l'ARNm, l'inefficacité de leur traduction ou encore pallier une demi-vie très courte de la protéine produite (Mirksch et al., 2005). Ces promoteurs peuvent être constitutifs ou inductibles. Contrairement aux promoteurs constitutifs qui imposent une charge métabolique supplémentaire aux cellules tout au long des cultures (Corrado and Karali, 2009), les promoteurs inductibles permettent de séparer les phases de croissance et de production. Ceci permet donc de premièrement constituer la biomasse nécessaire et d'ensuite déclencher la production. En ciblant la production sur quelques jours au lieu de la durée entière de la culture, ceci permet une meilleure uniformité des protéines produites et souvent mène à des rendements supérieurs. En effet, si on compare à un procédé où les protéines recombinantes sont produites tout au long de la culture, les protéines produites en début de culture seront souvent dégradées partiellement ou entièrement avant leur récolte ce qui aura pour conséquence de réduire les rendements globaux, mais également de compliquer les étapes de purification subséquentes en raison de leur forte similarité avec les protéines d'intérêt entières.

Comme il été décrit à la section 2.2.3.1, plusieurs types de promoteurs inductibles existent. Parmi ceux-ci, ceux reliés aux stress thermiques sont très faciles à utiliser en industrie (Yoshida et al., 1995). Un avantage majeur de ces stress est qu'il n'est pas nécessaire de changer les températures

des cultures à des niveaux pathologiques (i.e. mortels) pour obtenir l'effet désiré. Une variation d'environ 5 à 15°C pour une durée d'environ 2 heures est suffisante pour induire une réponse (Lee et al., 2007; Yoshida et al., 1995). Dans le cas où de telles variations de température sont utilisées, la viabilité des cellules n'est que peu ou pas affectée, ce qui permet de réaliser plusieurs vagues successives de stress et ainsi d'améliorer potentiellement et de maintenir les rendements sur de longues périodes (Aucoin et al., 2006; Lee et al., 2007). Toutefois, un stress à haute température, bien qu'il ait démontré pouvoir, dans certaines conditions, accélérer la production protéique (Baneyx, 1999b), peut conduire à des rendements finaux plus faibles en raison de la production de protéines de choc thermique (HSPs : *Heat Shock Protein*) parmi lesquelles on retrouve plusieurs protéases (Fujita, 1999). De plus, une accélération importante de la machinerie cellulaire a des conséquences négatives sur l'assemblage des protéines et peut mener à une hétérogénéité de leur profil de glycosylation ce qui a un impact direct sur la bioactivité des protéines (Fogolin et al., 2004). Pour cette raison, le développement de vecteurs inductibles au froid est de plus en plus exploré. Un premier vecteur d'expression inductible au froid a d'ailleurs été mis au point pour la bactérie *E. coli* dès 1999 (Mujacic et al., 1999) et des travaux similaires sont en cours pour la levure (Sahara et al., 2002) et pour les cellules de mammifères (Al-Fageeh et al., 2005). Plusieurs raisons expliqueraient pourquoi la production de protéines recombinantes à des températures plus faibles permettrait d'obtenir de meilleurs résultats surtout en termes de qualité de protéine, mais également en termes de quantité. Tout d'abord, les ARNs messagers seraient plus stables, ce qui prolongerait leur période de traduction (Mujacic et al., 1999). L'abaissement de la température ralentit quelque peu la chaîne de production protéique ce qui fait en sorte qu'une plus grande proportion des protéines sera repliée correctement, ce qui est essentiel pour qu'elles soient bioactives (Mujacic et al., 1999). Ceci aura également un impact sur la dégradation des protéines puisque lorsqu'elles sont bien repliées, elles exposent moins leurs sites

de clivage aux protéases (Mujacic et al., 1999). De plus, une exposition prolongée des cellules à des températures plus basses ferait en sorte qu'elles diminueraient leur production de protéases associée aux chocs thermiques à des niveaux inférieurs à ceux normalement présents dans les cellules non stressées (Taura et al., 1989). Par conséquent, il serait envisageable d'exposer, pendant quelques heures, les cellules à une basse température pour activer la production des protéines recombinantes et d'ensuite remonter quelque peu cette température sans retourner à la température optimale de croissance pour maintenir l'induction et conserver les bienfaits d'une faible température sur une plus longue période. Certaines études réalisées avec des cellules de mammifères montrent effectivement une hausse de productivité spécifique des cellules à une température inférieure de seulement 4°C à la température optimale (Fogolin et al., 2004). Dans le contexte particulier des cellules de plantes en bioréacteur, l'abaissement de la température permettrait aussi de réduire le bullage dans le milieu de culture puisque l'oxygène se dissout plus facilement à basse température, effet jumelé au phénomène de diminution de la consommation en O<sub>2</sub> attendue avec une activité métabolique inférieure à basse température. Ce mode opératoire permettrait de réduire potentiellement les problèmes relatifs à la formation de mousse (principalement causée par le bullage) et de limitation de transfert O<sub>2</sub>.

L'intérêt d'utiliser un promoteur fort inductible au froid pour améliorer le rendement d'une plateforme végétale en bioréacteur est donc certain. En plus d'améliorer la qualité des protéines produites et de possiblement augmenter leur quantité, un stress au froid pourrait très bien être combiné avec la transformation par coculture démontrée au chapitre précédent. Dans ce cas, l'utilisation d'un stress au froid pourrait être un moyen de maintenir ou de contrôler les populations d'*Agrobacterium* dans le milieu de culture et d'ainsi réduire leurs impacts négatifs sur les cellules. La phase de production pourrait donc être potentiellement prolongée ce qui aurait



pour effet d'améliorer les rendements. Dans ce chapitre, la méthodologie détaillée des travaux effectués en ce qui concerne l'identification et l'isolement de promoteurs inductibles au froid chez *Nicotiana tabacum* ainsi que les résultats expérimentaux sont rapportés. L'isolement de candidats par expression génique différentielle (*Differential Display*) et leur étude par analyse Northern et Northern inverse, qPCR, BLASTs et 5'-RACE sont décrits. Bien que les résultats finaux ne soient pas concluants, i.e. permettre d'identifier, de valider et de cloner des candidats de promoteurs potentiels, ils présentent l'état actuel de la recherche effectuée par le candidat sur ce volet.

## 5.2 Matériel et Méthode

### 5.2.1 Culture générale des cellules en suspension de *Nicotiana tabacum* (NT1)

La suspension de *Nicotiana tabacum* NT1 nous a gracieusement été fournie par le laboratoire de la Dre Nathalie Beaudoin, du département de Biologie de l'Université de Sherbrooke.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu KCMS, une variante du milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) contenant 30 g L<sup>-1</sup> glucose, 0,2 mg L<sup>-1</sup> d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Kinétine et 1,2 mg L<sup>-1</sup> de Thiamine-HCl. La lignée était sous-cultivée lorsque le volume de cellules sédimentées (*sedimented cell volume*, SCV) atteignait 70-80 % du volume total en 5 min (c'est-à-dire normalement à tous les 7 jours). La sous-culture était alors diluée selon un facteur 1/10 (15 mL de cellules dans 135 mL de milieu KCMS frais) dans un flacon Erlenmeyer de 500 mL maintenu à la noirceur à 27°C sur un agitateur rotatif (120 rpm). Tous les flacons Erlenmeyer étaient fermés par une double couche de papier d'aluminium.

### 5.2.2 Stress d'exposition des cellules au froid

Pour le test d'exposition au froid, 90 mL de milieu KCMS frais ont été inoculés avec 15 mL de suspension cellulaire vieilles de 7 jours (post-inoculation) dans un flacon Erlenmeyer de 500 mL. Tous les flacons étaient conservés dans un incubateur-agitateur à 27 °C et 120 rpm avant et après leur exposition à 12 °C ou 18 °C. Quatre traitements avec des durées d'exposition distinctes ont été testés, soit 6, 12, 24 et 48 heures, et tous les essais ont débutés au 2<sup>ème</sup> jour post-inoculation. Ces durées ont été choisies afin de permettre de vérifier si l'induction des gènes candidats perdurait lors d'une exposition prolongée au froid. Environ 15 mL de suspension cellulaire étaient récoltés tous les jours. Les échantillons étaient filtrés à l'aide de filtres en fibres de verre (GF/D) de 47 mm de diamètre (cat # 1823047, Whatman) ayant une porosité de 2,7 µm pour séparer les cellules du milieu. Le milieu était conservé à -20 °C alors que les cellules de plante étaient pesées pour la mesure du poids humide et placées dans un four à 50 °C pour une durée minimale de 24 heures pour obtenir le poids sec. Dans le cas des cultures induites, un échantillon était prélevé immédiatement à la fin de l'induction. Après avoir été filtrées, les cellules étaient broyées dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon et conservées dans des cryovials de 1,8 mL (cat # 72.379.005, Sarstedt) dans un vase de Dewar d'azote liquide (Thermo Forma, Forma Scientific, Marietta, Ohio). Toutes les expériences étaient réalisées simultanément en duplicata et les cultures ont été inoculées à partir d'un seul flacon mère.

La mesure du pH a été prise à l'aide d'un pH-mètre Accumet® model 805MP (Fisher) après que le milieu filtré soit revenu à la température de la pièce. La concentration en protéines totales a été mesurée à l'aide d'un kit Bradford (Sigma, cat # B6916) Les échantillons étaient dilués dans l'eau déionisée avant d'être dosés.

### 5.2.3 Extraction d'ARNs totaux

Pour l'analyse d'expression différentielle, les analyses de types Northern et Northern inverse de même que les qPCRs, les ARNs ont été extraits selon le protocole suivant : 1 mL de Tri-Reagent (Sigma T9424) a été ajouté à 200 mg de cellules broyées et congelées dans un microtube de 1,5 mL (Fisher # 05-408-129), le tout vortexé 1 minute. Après une incubation de 5 min à température pièce, 0,2 mL de chloroforme a été ajoutés et mélangés. Après une incubation de 15 min (température pièce), les échantillons ont été centrifugés (4 °C, 15 min, 12 000 g). Les surnageants ont été transférés dans des nouveaux microtubes dans lesquels 0,5 ml d'isopropanol ont été ajoutés. Les échantillons ont été incubés 10 min (température pièce) avant d'être centrifugés (4 °C, 15 min, 12 000 g). Les culots ont été lavés avec 1 mL EtOH 70 % et centrifugés (4 °C, 5 min, 7 500 g). Les nouveaux culots ont été séchés à l'air en laissant reposer les tubes sous la hotte pendant 10 min à la température de la pièce, resuspendus dans 50 µL d'eau traitée au DEPC (0,0001 % v/v DEPC, Sigma D5758). Les ARNs ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre ( $A_{260}$ ) et leur intégrité a été vérifiée sur gel d'agarose avant de les entreposer à -80 °C pour utilisation ultérieure.

### 5.2.4 Expression différentielle (*Differential Display*)

Pour réaliser cette analyse, un kit RNAmage® 3 (GenHunter Corporation, Nashville TN) a été utilisé. Cette technique permet d'isoler des fragments d'ADNc différenciellement représentés entre deux échantillons après une première étape de rétrotranscription de l'ARNm. Afin de simplifier l'analyse, le « pool » d'ARN messagers est divisé à l'aide de trois oligo-dT différents, chacun se terminant par une base autre que T (A, G, ou C). La réaction de transcription inverse est effectuée dans un volume total de 20 µl (0,2 µg ARNs totaux, 0,2 µM d'oligo-dT<sub>11</sub> (A, G ou C), 20 µM dNTP, 1X tampon RT et 100 U MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse*

*Transcriptase*) selon le programme suivant : 5 min à 65 °C, 60 min à 37 °C et 5 min à 75 °C. L'enzyme MMLV était toutefois ajoutée 10 min après le début du cycle à 37 °C afin d'éviter sa dénaturation. Une réaction de transcription inverse a été réalisée pour chacune des 5 conditions expérimentales (témoin 27 °C, induction 6 heures 12 °C, induction 12 heures 12 °C, induction 6 heures 18 °C et induction 12 heures 18 °C).

Le kit RNAimage 3 fournit huit amorces arbitraires numérotées 17 à 24 (les amorces 1 à 8 et 9 à 16 provenant des kits RNAimage 1 et 2 respectivement). En raison du nombre limité de puits disponible sur le gel, seules sept amorces ont été utilisées. (# 17 : 5'- AAGCTTACC AGGT - 3', # 18 : 5'-AAGCTTAGAGGCA-3', # 19 : 5'-AAGCTTATCGCTC-3', # 20 : 5'-AAGCTTGTGTGC-3', # 21 : 5'-AAGCTTTCTCTGG-3', # 22 : 5'-AAGCTTTTGA TCC-3', # 23 : 5'-AAGCTTGGCTATG-3'). Des réactions de PCR (2 µL de la réaction de rétrotranscription, 0,2 µM d'oligo-dT<sub>11</sub> (A, G ou C), 0,2 µM d'une amorce arbitraire (17 à 23), 2 µM dNTP, 0,2 µl α-[<sup>33</sup>P]dATP à 2000 Ci/mmmole, 1X tampon PCR et 1 U de Taq polymérase) ont été réalisées avec ces amorces selon le programme suivant : 30 s à 94 °C, 2 min à 40°C et 30 s à 72 °C pour un total de 40 cycles suivis par 5 min à 72 °C.

Afin de visualiser les différents produits d'amplification obtenus, un gel de séquençage de polyacrylamide 6 % (7.5 M urée) dans le Tris-Boric Acid-EDTA (TBE) en conditions dénaturantes a été préparé la veille. L'électrophorèse a débuté 30 min avant le chargement des échantillons avec du tampon de chargement dans un puits sur deux afin d'éliminer les traces d'urée dans les puits. Un volume de 3,5 µL des produits PCR radioactifs a été mélangé avec 2 µL du tampon de chargement et le tout a été incubé à 80 °C pendant 2 min avant d'être chargé sur le gel. L'électrophorèse a été effectuée à 60 W (ampérage constant à 150 mA) et a duré environ 3,5 heures, jusqu'à ce que le xylène cyanol (colorant le plus lent) atteigne le bas du gel. Le gel a alors été transféré par buvardage à l'aide d'un papier Whatman et enveloppé dans une pellicule

plastique. Le tout a été séché une heure. Deux films Kodak superposés ont été exposés au gel à -80 °C pendant 2 jours; la superposition permettant d'obtenir simultanément deux intensités différentes lors de la même exposition.

Les candidats intéressants révélés par le film ont été isolés en découpant le papier Whatman avec le gel, en plaçant le fragment dans un microtube et en ajoutant 50 µL d'eau déionisée. Pour amplifier ces fragments, une étape de PCR a été réalisée telle que décrit précédemment mais sans matériel radioactif. Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le vecteur TOPO® (Invitrogen, cat # K4575-01) selon la méthode suivante : 2 µL de produits d'amplification ont été ajoutés à 0,5 µL de la solution saline du kit et 0,5 µL du vecteur TOPO®. Le mélange a été incubé à température pièce pour la nuit et a ensuite été utilisé pour transformer des cellules chimio-compétentes TOP 10 fournies dans le kit.

Pour chacun des candidats, un stock cellulaire a été préparé en prenant 1 mL de suspension à une D.O.<sub>600</sub> d'environ 0.8 et en ajoutant 70 µL de DMSO stérile. Les cellules étaient incubées une heure à température pièce avant d'être mises à -20 °C pour une nuit et d'être transférées à -80°C par la suite. Un stock plasmidique a également été préparé à l'aide d'un kit miniprep (Genscript, cat # L00193).

Les candidats clonés dans les vecteurs TOPO® ont été envoyés au centre de génomique de l'IRIC (Montréal, QC) pour être séquencés avec les amorces T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') et T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Les séquences obtenues ont été utilisées pour une recherche de type BLAST dans les banques de données disponibles ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com))

### 5.2.5 Analyse Northern et Northern inversé (Reverse Northern)

Pour chacune des conditions expérimentales analysées en Northern, 10 µg d'ARNs étaient précipités dans 2,5 volumes d'éthanol toute la nuit avant d'être centrifugés 30 min à 10 000g à 4 °C. Le culot était ensuite lavé avec 1 volume d'éthanol 70 % et centrifugé 10 min à 10 000g à 4 °C. Une fois séché, le culot était hydraté à l'aide de 4,8 µL de tampon A (150 mM MOPS, 3 mM EDTA, pH 7,3) et 9,2 µL de solution F/F (10 % formaldéhyde, 0,8 M formamide recristallisée). Les échantillons étaient ensuite chauffés à 70 °C pendant 10 min pour dénaturer l'ARN avant d'être rapidement refroidis sur glace. Trois (3) µL de tampon de chargement était finalement ajoutés avant de charger les puits avec le volume entier. Le gel était à 1 % agarose, 50 mM MOPS, 1 mM EDTA et 6 % formaldéhyde dans un tampon 50 mM MOPS et 1 mM EDTA. L'électrophorèse du gel était effectuée à 100 V pendant 1h30-2h00. Le gel était lavé trois fois 2 min dans l'eau déionisée avant d'être lavé deux fois 15 min avec une solution de NaOH 50 mM et NaCl 10 mM. Le gel était ensuite lavé deux fois 15 min dans une solution de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 avant d'être équilibré 30 min dans du SSC 20X. Le transfert sur membrane Hybond N+ (GE HealthCare) se faisait par buvardage toute la nuit. L'ARN était fixé sur la membrane par la formation de lien covalent en exposant la membrane à un rayonnement ultraviolet (120 mJ/cm<sup>2</sup>). Les membranes ont ensuite été préhybridées pour un minimum d'une heure à 45 °C dans un tampon formamide (0,55 M formamide déionisée, SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 1 %, 10 mg ADN de sperme de saumon).

Pour la préparation des sondes, deux protocoles différents ont été utilisés. Le premier est un protocole Ambion qui permet d'enlever les sondes (*stripper*) pour réhybrider les membranes avec d'autres candidats. Dans ce protocole, 100 ng (9 µL) de produits PCR T3/T7 pour chacun des candidats analysés ont été dénaturés pendant 5 min à 95 °C avant d'être placés sur glace. Les composants du kit suivant ont été ajoutés : 2,5 µL de la solution de décamères 10X, 5 µL de

tampon 5X sans dATP et dCTP, 2,5  $\mu\text{L}$  dCTP 10X, 5,0  $\mu\text{L}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP (50  $\mu\text{Ci}$ ) et 1  $\mu\text{L}$  de fragment de Klenow sans activité exonucléase. Le mélange a été incubé 30 min à 37 °C avant que la réaction ne soit arrêtée par l'ajout de 75  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.0. Dans le second protocole, 100 ng (11  $\mu\text{L}$ ) de produits PCR T3/T7 ont été dénaturés pendant 5 min à 95 °C. Cet ADN a été ajouté aux composantes du kit *Nick translation labelling kit* (Roche), à savoir 1  $\mu\text{L}$  de dATP, 1  $\mu\text{L}$  dGTP, 1  $\mu\text{L}$  dTTP, 2  $\mu\text{L}$  de tampon 10X, 2  $\mu\text{L}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (20  $\mu\text{Ci}$ ) et 2  $\mu\text{L}$  du mélange d'enzyme. Le tout a été incubé 35 min à 15 °C avant que la réaction ne soit arrêtée avec 1  $\mu\text{L}$  0,5 M EDTA pH 8.0. Les sondes ont ensuite été purifiées par un passage (4 min, 1100 g) sur une colonne G-50 préalablement asséchée. Un (1)  $\mu\text{L}$  des sondes a été utilisé pour vérifier l'incorporation de la radioactivité; le reste a été dénaturé 5 min à 95 °C avant d'être ajouté à du tampon d'hybridation frais avec les membranes. Les membranes ont été incubées à 45 °C toute la nuit avec les sondes.

Les membranes ont subi plusieurs lavages successifs, soit 15 min dans une solution 2X SSC/0,1 % SDS à 25 °C et 15 min à 35 °C, 15 min dans une solution 1X SSC/0,1 % SDS à 45 °C et 15 min à 55 °C et finalement 10 min dans une solution 0,1X SSC/0,1 % SDS à 55 °C. Un écran photosensible a été exposé une nuit aux membranes. Les images ont ensuite été révélées à l'aide d'un PhosphorImager Typhoon 9200 (GE HealthCare).

Northern inverse a été réalisé sous forme de « Slot blot ». Trois membranes identiques ont été préparées, chacune pour une température expérimentale (témoin 27°C, exposition 6 heures 12°C et exposition 6 heures 18°C). Pour chacun des candidats, 1,5  $\mu\text{g}$  de produit PCR T3/T7a été déposée par puits. La membrane a été séchée et l'ADN fixé par une exposition aux rayons ultraviolets (120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). La membrane a ensuite été hybridée à 65 °C dans la solution de pré-hybridation pour bloquer les sites non-spécifiques. Trois groupes de sondes ont été préparés à partir d'ARNm extraits de cultures cellulaires cultivées dans les conditions suivantes : témoin 27

°C, incubation 6 heures 12 °C et incubation 6 heures 18 °C. Le mélange suivant a été préparé : 2 µg d'ARN, 5 µg d'oligo dT<sub>20</sub>, 1 mM dGTP, 1mM dCTP, 1mM dTTP, 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, Tampon RT 1X, 0,01 M DTT, 100 U d'inhibiteur de RNase et 500 U de MMLV. La rétrotranscription a été effectuée selon le programme suivant : 5 min à 65 °C, 60 min à 37 °C et 5 min à 75 °C. L'enzyme MMLV a toutefois été ajouté 10 min après le début de l'incubation à 37 °C. La purification et la validation des sondes ont été réalisées de la même façon que pour les analyses Northern de même que l'hybridation, les lavages et la révélation.

#### 5.2.6 Analyse qPCR:

La réaction de rétrotranscription a été réalisée avec 0,05 µg/µL oligo dT et 20 U/µl MMLV en présence de 500 µM dNTP, 0,625 U/µL inhibiteur de RNase et de tampon 5X fourni avec l'enzyme (tous les réactifs étaient fournis par Pharmacia-Amersham, Baie-d'Urfée, Québec, Canada). Un µg de l'ARN (5 µL) était dénaturé pendant 15 min à 75 °C avant que l'oligo dT ne soit ajouté; le tout était laissé 3 min sur glace pour permettre l'appariement des bases. Les autres réactifs étaient ensuite ajoutés et le mélange était incubé une heure à 37°C. La transcriptase inverse était ensuite inactivée par chauffage à 94°C pendant 5 min. Le produit de la réaction était dilué 5 fois avec de l'eau avant d'être utilisé pour le PCR quantitatif.

La réaction de qPCR a été réalisée à l'aide d'un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australie) en utilisant du SybrGreen pour quantifier l'ADN produit par six candidats de gènes induits au froid (A1, A2, G1, G2, G7 et C6) et deux gènes témoins (actine et ubiquitine de *Nicotiana tabacum*). Les amorces utilisées permettaient de synthétiser un fragment d'environ 150 pb pour tous les échantillons et leur température de fusion était de 63 °C en moyenne. Les amorces utilisées sont les suivantes : A1-F 5'-ATAAAATCAATAAGGAGCGGTTGAA-3 et



A1-R, 5'-CCAAGTCGCATTACACCC TTCAT-3', A2-F 5'-TGGTGGCATGGTGGTAGTTGATA-3' et A2-R 5'-TGGTGGCA TGGTGGTAGTTGATA-3', G1-F 5'-TTCAAGAGGGAAATATTGGATATTC-3' et G1-R 5'-CACTATTATGTCATTAATATGATATGTA-3', G2-F 5'-TATATGGGTGCA GAATTCCTTATAG-3' et G2-R 5'-GACTATAATAACTTGTAATAACTTTTG-3', G7-F 5'-GAAATGAGCTATAATGAAAGATTCCT-3' et G7-R 5'-AGGGGGTGTACT ATTATACAAATTG-3, C6-F 5'-GGGGCATGACACTGAAGATTGTT-3 et C6-R 5'-CGAGTCAGTGATAGCAACGATAG-3', Actine-NT-F 5'- CTCTTGCTCCCAGCAGC ATGAA- 3' et Actine-NT-R 5'-AAGCATTTGCGGTGGACAATGGA -3', Ubiquitine-NT-F 5'-AGCTCTGACACCATCGACAATGT- 3' et Ubiquitine-NT-R 5'-GAAACCA CCACGGAGACGGAG -3'. Le mélange PCR optimisé consiste en 4 µL d'ADNc, tampon de réaction 1X, 200 µM dNTP, 200 nM de chacune des amorces 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, SybrGreen 0,3X (d'un stock 10 000X de la compagnie Molecular Probes, Eugene, OR, USA) et de 0,05 U/µL JumpStart Taq Polymérase (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario). La PCR a débuté avec une étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 94 °C, suivie de 7 cycles avec un *touchdown* entre 60 °C et 53°C (20 s à 95°C, 20 s à 60°C (abaissement de 1°C par cycle jusqu'à 53°C), 30 s à 72°C, 10 s à 82°C) et finalement 40 cycles de PCR classique (20 s à 95°C, 20 s à 57°C, 30 s à 72°C, 10 s à 82°C). Une lecture de fluorescence était effectuée pour chaque cycle à 72°C et 82°C; la lecture à 82°C a été choisie pour éliminer le signal des dimères d'amorces. La courbe de dissociation (*melting curve*) a été obtenue à la fin du PCR en augmentant la température de 72°C à 99°C.

Toutes les réactions ont été réalisées en triplicata. Les valeurs obtenues pour chacun des candidats ont été normalisées avec le signal de l'actine. Pour les candidats, la valeur obtenue avec le témoin 27°C a servi de référence pour la comparaison relative d'expression.

### 5.2.7 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Pour cette procédure, un protocole commercial a été utilisé (Invitrogen, cat # 18374-058). Pour chacun des candidats (A1, A1, A3 et G8), trois amorces spécifiques (GSP : *gene specific primer*) ont été mises au point (Montréal Biocorp., Montréal). Ces amorces correspondent aux séquences suivantes : A1-GSP1 5'-AAATTCCTACGACGAACATCCGAAT-3', A1-GSP2 5'-ATGACTCTAAGCAGTCTTCAACCG-3', A1-GSP3 5'-ATTTTATCTCTTTC CATAGCCAAGCT-3', A2-GSP1 5'-CAGAGACTTAATTTTCATTAAGATGCTA-3', A2-GSP2 5'-ACCGTCTGCCATTATCAACTACCA-3', A2-GSP3 5'-ACCAACAC CACCATAGCCAAGCT-3, A3-GSP1 5'-ATGTGCTATAGCCCACACCTCCT-3', A3-GSP2 5'-CCACAGGACCCCGAAAGCCTAA-3' A3-GSP3 5'-ACCTCAGTAGC CATAGCCAAGCT-3, G8-GSP1 5'-ATGTGATTGTATTACATTACGAAT-3', G8-GSP2 5'-TATTC TCTCTTCTCTTCCCTCGATT-3', G8-GSP3 5'-CTTCTTGTTCTTC CATCGCCATAG-3'. Cinq (5) µg d'ARN totaux provenant des cellules de *Nicotiana tabacum* NT1 induites à 12 °C pendant 6 heures ont été utilisés. Pour chacun des candidats, l'ARN et 2,5 pmole de la première amorce spécifique (GSP1) ont été dénaturés pendant 10 min à 70 °C et refroidis rapidement sur glace. Le mélange a ensuite été complété pour atteindre les concentrations de réactifs suivants : tampon PCR 1X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP mix, 10 mM DTT, 8 U/µL SuperScript II RT. Il a ensuite été incubé à 42 °C pendant 50 min. L'enzyme a été inactivé par une incubation à 70 °C pendant 15 min. Pour dégrader l'ARN, 1 µL de "RNAse mix" a été ajouté avant d'incuber les échantillons à 37 °C pendant 30 min.

Les brins d'ADNc ont été purifiés par passage sur colonne S.N.A.P. Cent-vingt (120) µL de tampon de liaison (6M NaI) ont été ajoutés aux 25 µL de la réaction de rétrotranscription. Le mélange a été déposé sur une colonne S.N.A.P et centrifugé à 13 000 g pendant 20 s. Après avoir jeté l'éluat, la colonne a été lavée deux fois avec 400 µL de tampon de lavage froid. La colonne a

ensuite été séchée 1 min par centrifugation à 13 000 g. Finalement la colonne a été transférée dans un nouveau microtube et 50 µL d'eau déionisée chaude (65 °C) ont été utilisés pour procéder à l'élution. Une centrifugation finale de 20 s à 13 000 g a permis de récolter les ADNc.

Afin de pouvoir procéder à une amplification PCR, les fragments ADNc doivent avoir une queue de cytosines en 5'. Cet ajout est réalisé avec la Terminal deoxynuclotidyl Transferase (TdT). Pour ce faire, 10 µL de l'éluat d'ADNc purifié sont dénaturés à 94 °C pendant 3 min avant d'être placés sur glace. Cinq (5) µL de tampon de transfert 5X, 2,5 µL de dCTP (2 mM) et 6,5 µL d'eau-DEPC sont ensuite ajoutés pour atteindre les concentrations optimales de 1X de tampon et 0,2 mM dCTP. Un (1) µL de TdT est finalement ajouté avant d'incuber le mélange à 37 °C pendant 10 min. L'enzyme est inactivée par un passage à 65 °C pendant 10 min.

Une première réaction d'amplification PCR a été réalisée en utilisant la seconde amorce spécifique (GSP2) et une amorce du kit (*Abridged Anchor Primer*: AAP 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3') s'appariant à l'oligo dC en 5'. 50 µL de réaction PCR ont été préparés avec les conditions suivantes : 5,0 µL d'ADNc avec une queue dC en 5', tampon PCR 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix, 0,4 µM GSP2, 0,4 µM amorce AAP et 0,05 U/µL Taq DAN polymérase (Genscript). L'amplification a été réalisée de la façon suivante : l'ADN a été initialement dénaturé pendant 2 min à 94 °C suivi de 35 cycles de 45 s à 94 °C, 45 s à 55 °C et 90 s à 72 °C et d'une extension finale de 7 min à 72 °C.

Une dilution 1/100 de la première réaction PCR dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) a servi à réaliser une PCR nichée. Cette PCR a été réalisée avec la troisième amorce spécifique (GSP3) et une amorce du kit (*Universal Amplification Primer*: UAP 5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'). L'amplification a été réalisée selon les mêmes conditions que la première PCR.

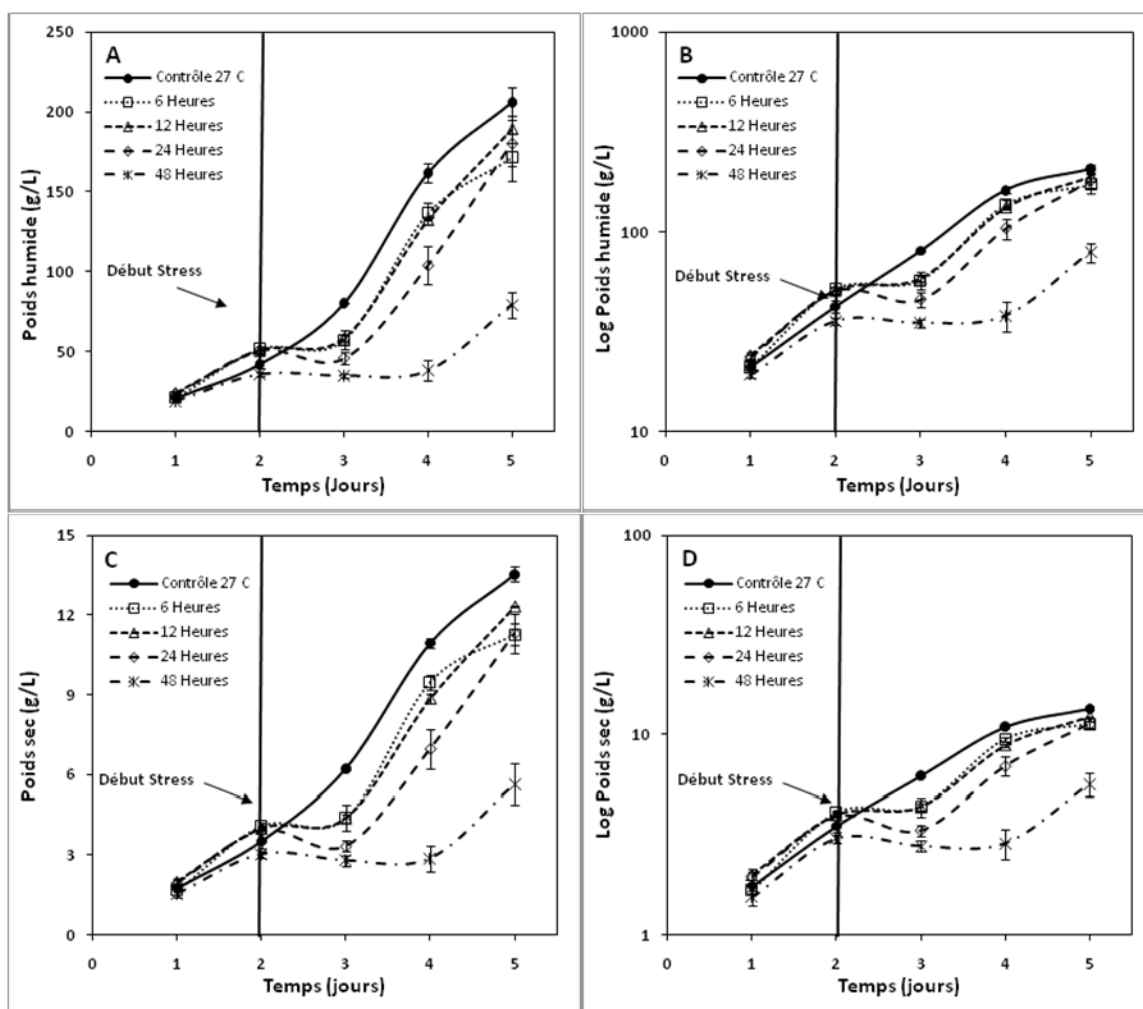
Une deuxième tentative de 5'-RACE a été réalisée en utilisant comme première amorce un oligo dT<sub>20</sub>. Les première et deuxième PCR ont été effectuées avec les amorces GSP1 et GSP2 respectivement.

### 5.3 Résultats et discussion

#### 5.3.1 Un stress au froid affecte peu la croissance et la viabilité des cellules de plante

Afin d'effectuer l'analyse différentielle de l'expression génique (*Differential display*) et d'identifier des gènes candidats pour l'isolement de promoteurs inductibles, il était essentiel d'exposer les cellules de tabac NT1 au froid. Au lieu de se limiter à exposer les cellules pour en extraire les ARNs messagers, un suivi de la biomasse (poids humide et sec), du pH extracellulaire et de la quantité de protéines extracellulaires a été réalisé afin de préciser les impacts de l'abaissement de la température. Deux températures ont été testées, à savoir 12 °C et 18 °C, ce qui correspond à une baisse de 15 °C et 9 °C respectivement par rapport à la température de culture habituelle de 27 °C. Les cellules ont été cultivées 2 jours à 27°C avant de débiter le stress pour une période de 6, 12, 24 ou 48 heures. Une fois le stress terminé, les cellules voyaient leur température de culture retourner à 27°C pour le restant de la culture.

Comme l'indiquent les figures 5.1 A-D, l'exposition des cellules de plantes à une température de 12 °C a eu un impact sur leur croissance puisque cette dernière semble s'être suspendue pendant la période d'exposition. Les cellules ayant été exposés 6, 12 ou même 24 heures ont toutefois pu atteindre une valeur finale de biomasse très similaire à celle du témoin; la différence s'expliquant

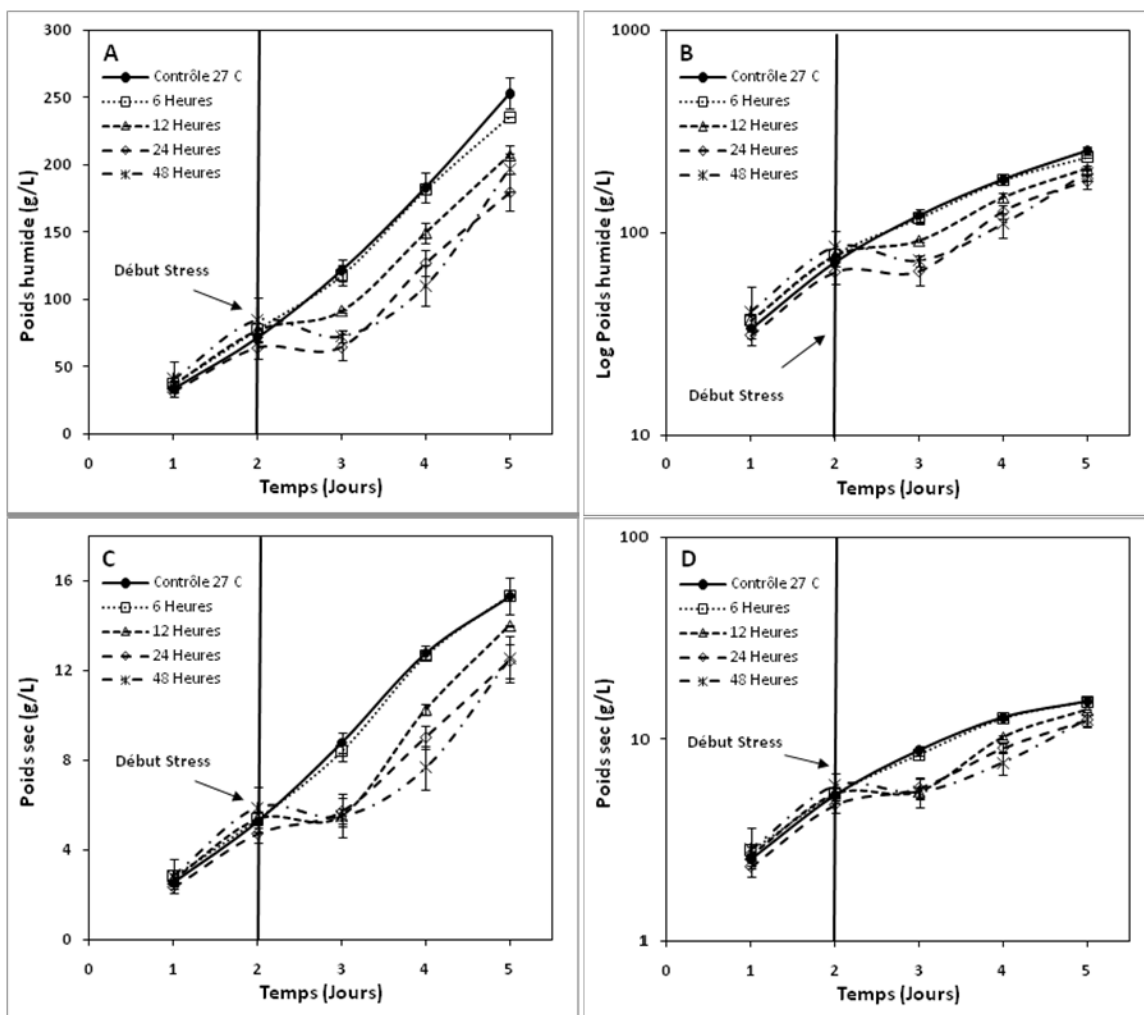


**Figure 5.1** Suivi de l'impact sur la croissance des cellules de *Nicotiana tabacum* NT1 de l'exposition à une température de 12 °C. **A et B:** Poids humide (g/L) **C et D:** Poids sec (g/L). La culture contrôle a été réalisée à 27 °C alors que les autres groupes ont été exposés à 12 °C pour différentes durées avant de retourner à 27 °C.

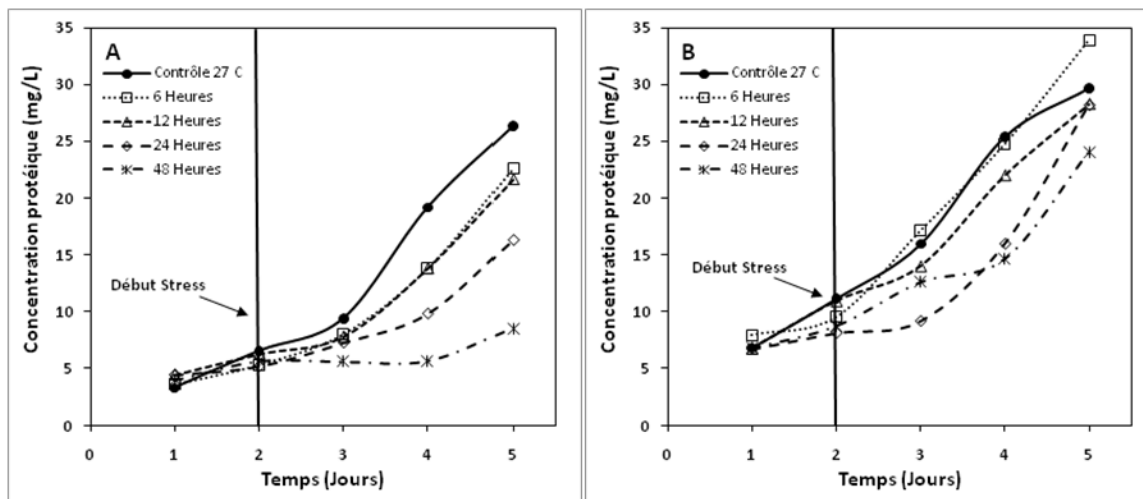
principalement par le retard causé par une exposition à une température non optimale. Dans le cas des cellules exposées 48 heures, la biomasse finale est très inférieure mais elle aurait probablement pu atteindre une valeur supérieure si la culture avait été prolongée. Il faut toutefois noter que dans ce cas particulier, les cellules avaient perdu leur couleur blanc/beige pour devenir légèrement grises. On peut donc conclure qu'une exposition prolongée à une température d'environ 12 °C a un impact négatif sur les cellules et qu'il serait préférable de limiter cette période à moins de 24 heures. L'exposition à 18 °C a, quant à elle, eu encore moins d'impacts. Les cellules exposées au froid pendant une période de 6 heures présentent une courbe de croissance pratiquement identique au contrôle si on considère les écarts-types (Figures 5.2 A-D). L'abaissement de la température a néanmoins entraîné un retard de croissance par rapport au contrôle. Contrairement à ce qui est observé pour une température de 12 °C, la croissance n'est pas totalement arrêtée lorsque les cellules sont exposées à 18 °C pour 48 heures. De plus, elles conservent une belle couleur blanc/beige suggérant une meilleure viabilité.

Dans le cadre d'un procédé industriel, il serait intéressant d'induire les cellules à une température aux environs de 10-12°C et d'ensuite remonter la température de culture aux environs de 18°C afin de maintenir l'induction. Ceci permettrait donc de combiner le pouvoir d'induction d'une basse température tout en limitant ses effets négatifs sur les cellules.

Le suivi de la concentration protéique extracellulaire (Figure 5.3) semble indiquer qu'il n'y a pas de relargage massif de protéines lors des périodes d'exposition au froid. En effet, l'augmentation de la concentration protéique dans le milieu semble liée à la croissance des cellules (Figures 5.1 et 5.2). Comme le froid retarde la croissance, il retarde également la sécrétion de protéines dans le milieu. Bien qu'une exposition au froid puisse réduire la production de protéines



**Figure 5.2** Suivi de l'impact sur la croissance des cellules de *Nicotiana tabacum* NT1de l'exposition à une température de 18 °C. A et B: Poids humide (g/L) poids humide C et D: Poids sec. La culture contrôle a été réalisée à 27 °C alors que les autres groupes ont été exposés à 18 °C pour différentes durées avant de retourner à 27 °C



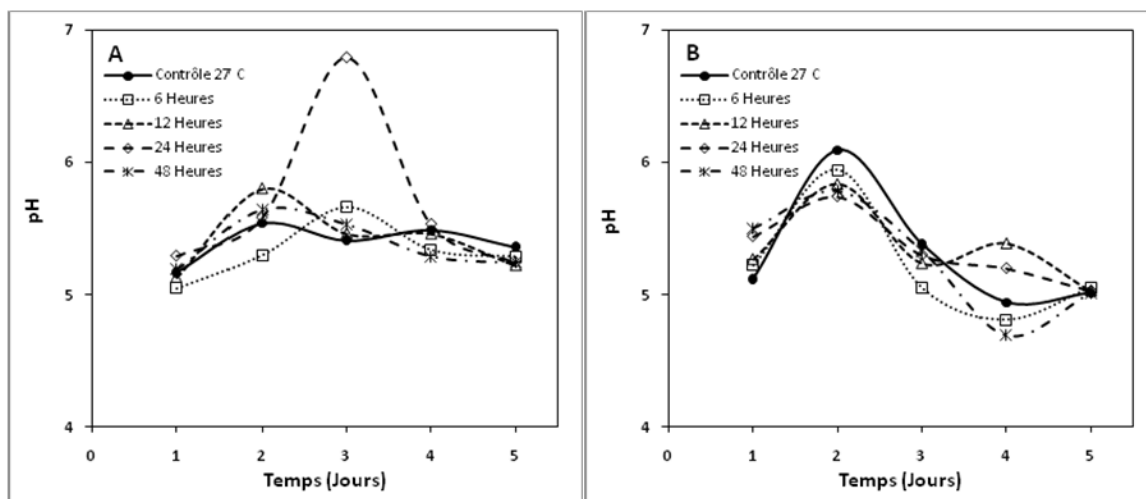
**Figure 5.3** Suivi de l'impact d'une température inférieure à la température optimale sur la concentration protéique extracellulaire de cellules de *Nicotiana tabacum* NT1 A) Exposition à 12 °C B) Exposition à 18 °C. La culture contrôle a été réalisée à 27 °C alors que les autres groupes ont été exposés à 12 °C ou 18 °C pour différentes durées avant de retourner à 27 °C



recombinantes, une exposition au froid pourrait permettre de réduire la quantité de protéines extracellulaires et ainsi faciliter les étapes de purification subséquentes.

Le pH du milieu de culture frais se situe aux environs de 5.7. Quelques heures après l'inoculation, on observe généralement un abaissement du pH causé par le relargage de protons par les cellules lors de l'absorption du phosphate du milieu. La première valeur de pH a été prise au jour 1 (Figure 5.4) et témoigne de ce phénomène d'acidification du milieu avec des valeurs pH situées entre 5,0 et 5,5.

Pour tous les groupes et ce, pour les deux températures testées, une hausse du pH est observée au jour 2 (Figure 5.4). Cette hausse ne peut être attribuée au stress au froid puisque l'échantillon de ce jour était prélevé avant de débiter l'incubation. Le pH diminue ensuite pour se stabiliser entre 5,0 et 5,2. Dans le cas du stress à 12 °C, un point diffère significativement des autres puisqu'il affiche une valeur de 6.8 (Figure 5.4.). Puisque un seul des flacons du duplicata était analysé pour ce test, il est difficile d'affirmer avec certitude que ce point provient d'une erreur de mesure. Néanmoins, si on compare avec le flacon soumis à un stress de 48 heures, qui, au jour 3, a été soumis à la même période que celui de 24 heures, il affiche une valeur similaire aux autres échantillons. On peut donc supposer que cette valeur provient effectivement d'une erreur expérimentale. Les cellules de plantes contrôlent en général assez bien la valeur de pH du milieu et puisque les valeurs de pH des flacons soumis aux stress de température suivent la tendance du témoin, on peut conclure que l'impact du froid est faible sur le pH extracellulaire.



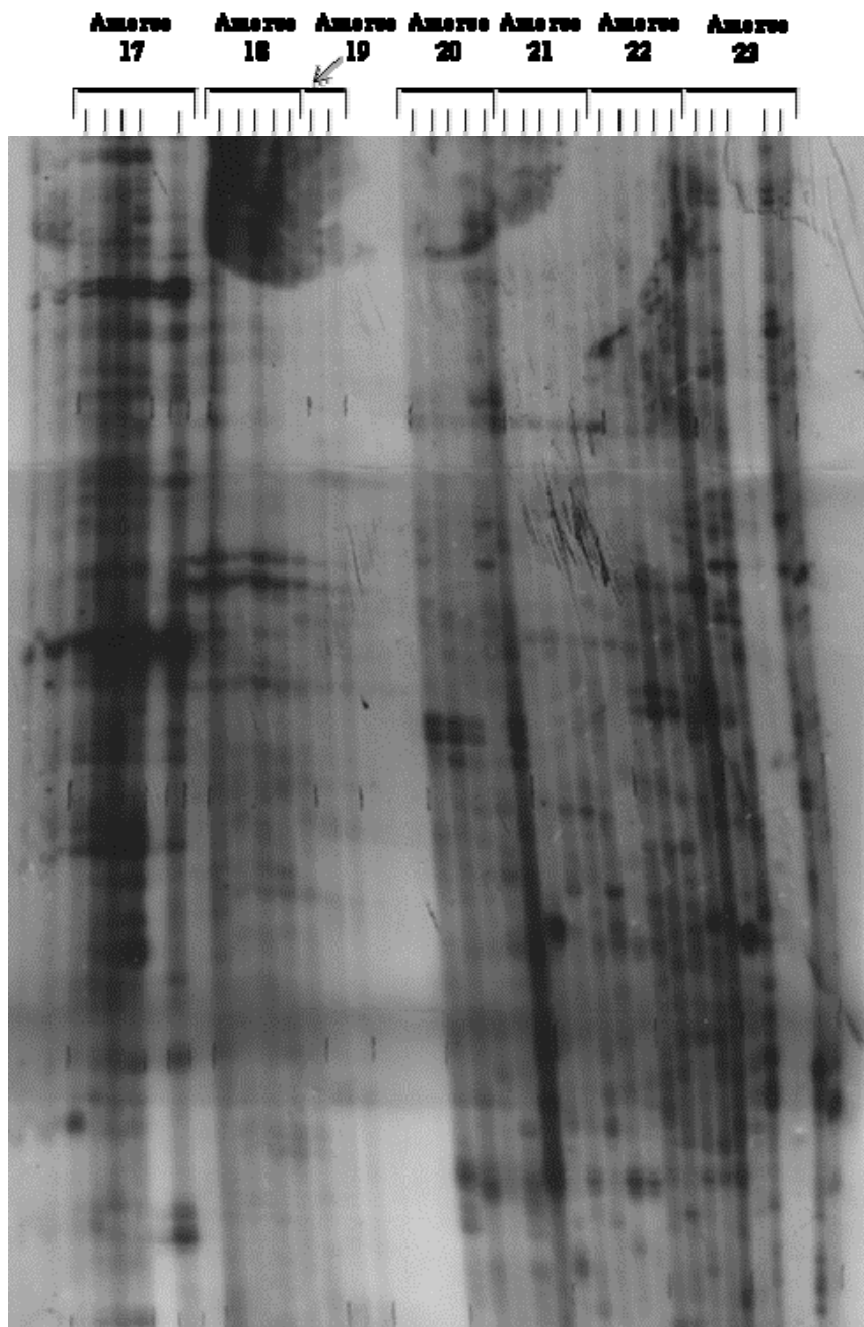
**Figure 5.4** Suivi de l'impact d'une température inférieure à la température optimale sur le pH extracellulaire de cellules de *Nicotiana tabacum* NT1 A) Exposition à 12 °C B) Exposition à 18 °C. La culture contrôle a été réalisée à 27 °C alors que les autres groupes ont été exposés à 12 °C ou 18 °C pour différentes durées avant de retourner à 27 °C

### 5.3.2 Sélection de gènes candidats par analyses d'expression différentielle

Afin de diviser le « pool » d'ARNm, trois analyses d'expression différentielle ont été réalisées, chacune utilisant un oligo dT se terminant soit pas la base A, G ou C. Cinq conditions étaient analysées dans l'ordre suivant : témoin 27°C, induction 6h 12°C, induction 12h 12 °C, induction 6h 18 °C, induction 12h 18 °C et ce avec sept amorces dégénérées (# 17 à 23). La figure 5.5 présente une image numérisée du film obtenu lors de l'analyse utilisant l'oligo dT-A. Pour chacune des analyses (A, G et C), huit candidats ont été clonés dans le vecteur TOPO®; les patrons d'expression de ces candidats sont présentés à la figure 5.6. Les séquences isolées, disponibles en Annexe 2, ont toutes une taille se situant entre 50 et 425 pb (Tableau 5.1). Dans certains cas, lors des étapes de clonage dans le vecteur TOPO, plus d'une séquence ont été isolée. Bien que ces séquences n'avaient pas la taille attendue selon leur position sur le gel, elles ont été conservées. Elles sont identifiées par un astérisque. Les fragments pouvaient s'insérer dans les deux sens dans le vecteur TOPO. Afin de faciliter la compréhension, les séquences de l'Annexe 2 sont toutes placées de façon à ce qu'elles se terminent avec la queue poly-A en 3'; le sens d'insertion et l'amorce dégénérée utilisée sont toutefois mentionnés.

### 5.3.3 Analyse Northern et Northern inverse

Puisqu'un total de 34 séquences différentes ont été isolées à la suite de l'analyse d'expression différentielle, il était nécessaire de valider ces candidats et d'ainsi réduire leur nombre avant de poursuivre les étapes pour l'isolement des promoteurs. La méthode initiale de validation qui a été tentée est l'analyse Northern, c'est-à-dire une analyse de l'expression des gènes (ARNm) à l'aide de sondes marquées radioactivement. Huit analyses ont été réalisées en parallèle pour les candidats ayant les tailles les plus élevées et démontrant un patron d'expression induit au froid (A3, A4, G1, G2, G4, G5, G6 et G7). Bien que les sondes présentaient une bonne intégration de



**Figure 5.5. Patron de bandes obtenu lors de la première analyse d'expression différentielle (*Differential Display*) avec l'oligo-dT (A).** Pour chaque amorce dégénérée, 5 conditions étaient analysées dans l'ordre suivant : Contrôle 27 °C, 12 °C 6 heures, 12 °C 12 heures, 18 °C 6 heures et 18°C 12 heures. Pour les amorces 17 et 23, une travée vide sépare les échantillons. Pour l'amorce 19, seuls le contrôle et l'exposition 6 heures à 12°C ont été réalisés.

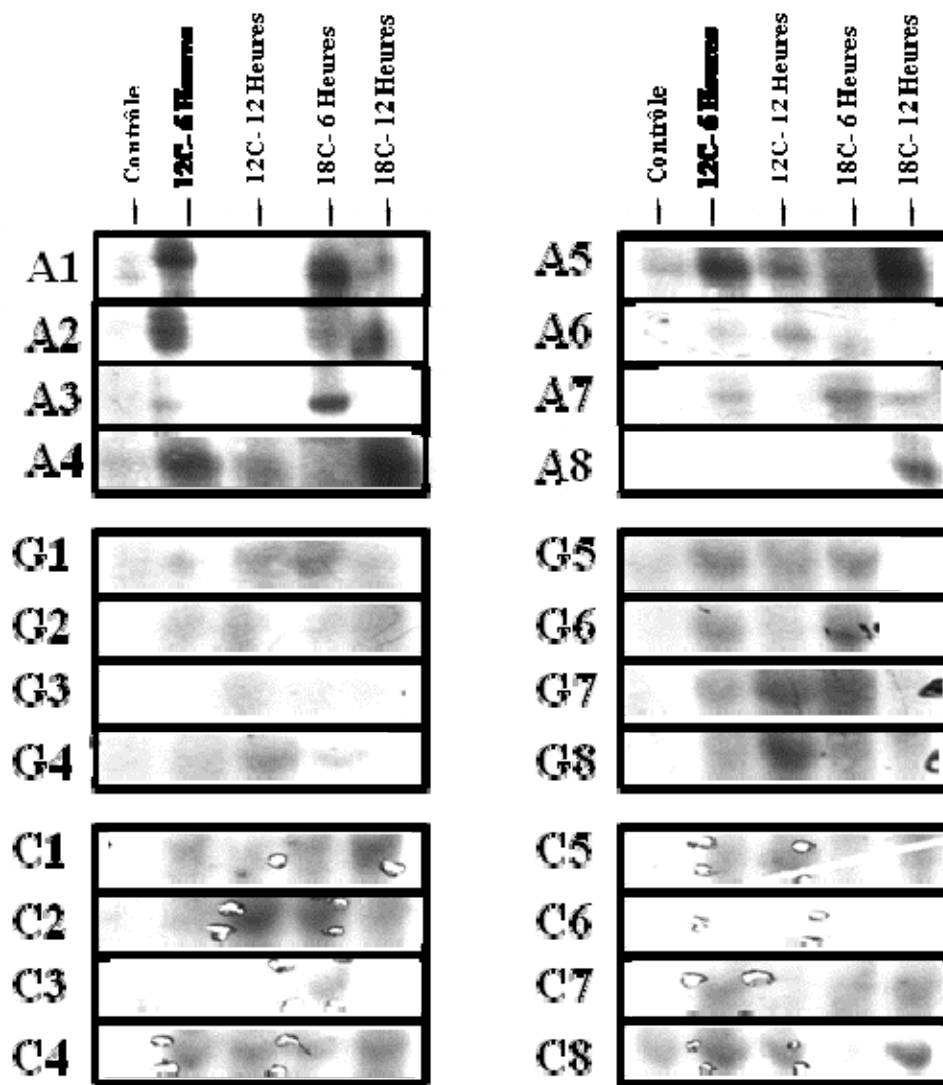


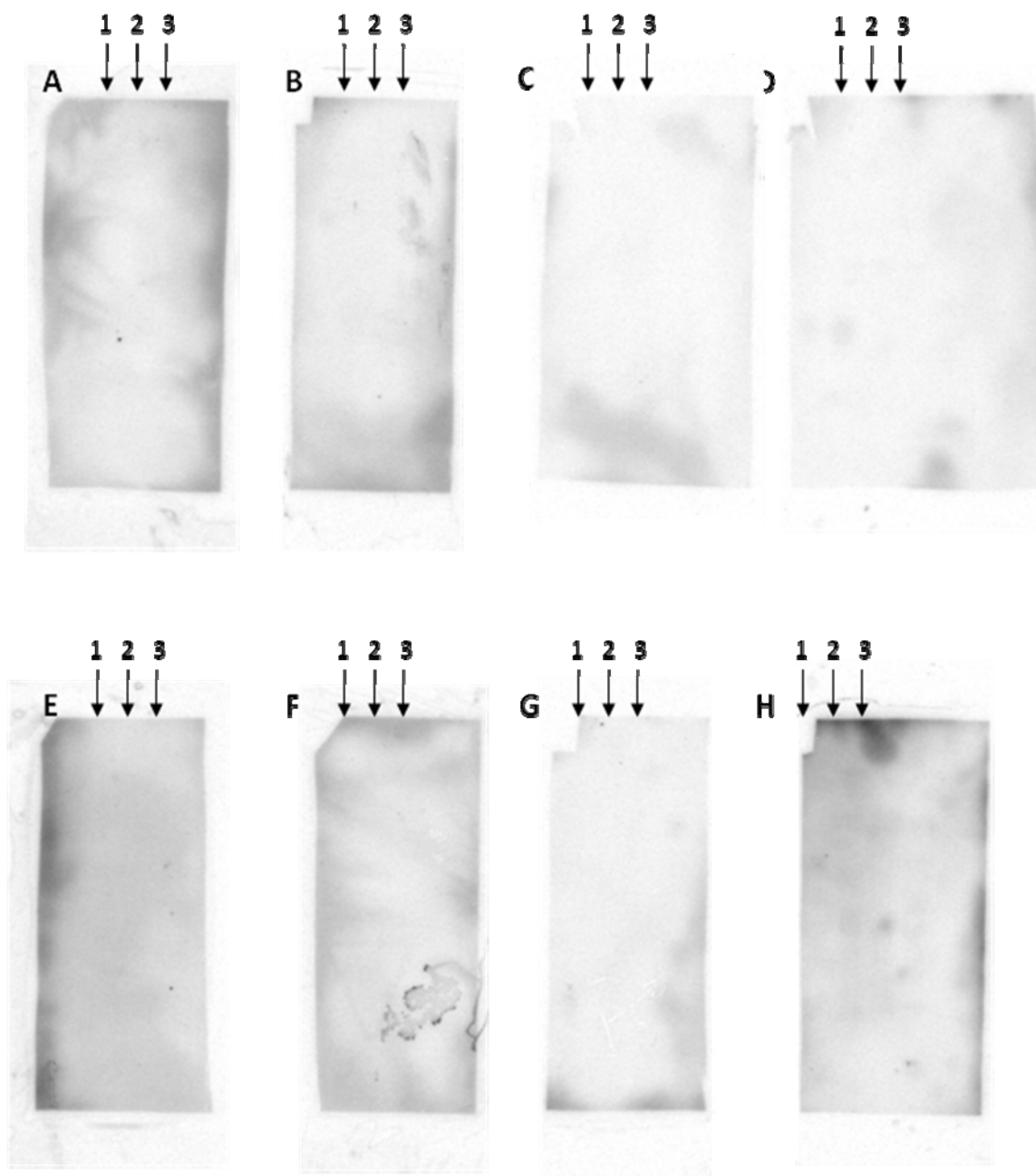
Figure 5.6 Patron d'expression des 24 candidats isolés lors des analyses d'expression différentielle avec les oligo-dT (A), (G) et (C).

**Tableau 5.1 Résumé des tailles des fragments isolés lors  
des analyses d'expression différentielle**

<b>Oligo-dT (A)</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Oligo-dT (G)</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Oligo-dT (C)</b>	<b>Taille (pb)</b>
<b>A1</b>	177	<b>G1</b>	251	<b>C1</b>	90
<b>A2</b>	175	<b>G1*</b>	198	<b>C1*</b>	52
<b>A3</b>	343	<b>G2</b>	227	<b>C3</b>	190
<b>A3*</b>	65	<b>G3</b>	198	<b>C4</b>	127
<b>A4</b>	231	<b>G4</b>	361	<b>C4*</b>	80
<b>A5</b>	231	<b>G4*</b>	120	<b>C5</b>	81
<b>A6</b>	210	<b>G5</b>	291	<b>C6</b>	425
<b>A7</b>	162	<b>G5*</b>	167	<b>C6*</b>	245
<b>A7*</b>	91	<b>G6</b>	233	<b>C7</b>	99
<b>A8</b>	131	<b>G7</b>	334	<b>C7*</b>	40
		<b>G7*</b>	290	<b>C8</b>	50
		<b>G7**</b>	213		
		<b>G8</b>	307		

la radioactivité (activité spécifique élevée), les signaux obtenus sur les membranes étaient très faibles (Figure 5.7). En effet, aucune bande n'était observable dans la majorité des cas. Sur la figure, seule la sonde du candidat G7 semble démontrer une induction à 12 °C par rapport au contrôle. Toutefois, lors de la reprise de ce test une seconde fois, la membrane ne présentait aucune bande.

Les analyses Northern ont été réalisées à plusieurs reprises avec des stocks d'ARN frais dont l'intégrité a été vérifiée, de la radioactivité récente, des étapes de lavage réduites et/ou moins stringentes afin d'éviter que les sondes ne se décrochent. Malheureusement, tous ces essais se sont avérés vains puisque aucune bande n'a pu être visualisée sur les membranes (résultats non présentés). Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats serait que les fragments de sondes utilisés étaient trop petits pour bien se fixer à l'ARN sur les membranes. En effet, les premiers tests utilisaient une sonde synthétisée à l'aide d'un kit Roche (*High Prime DNA labelling*) qui se base sur l'appariement d'amorces aléatoires sur les fragments d'ADN référence. Par conséquent, les sondes peuvent être plus ou moins longues en fonction du lieu d'appariement. Afin de palier ce problème, un autre kit Roche (*Nick translation labelling*) a été utilisé pour produire les sondes de la figure 4.7. Cette méthode de synthèse de sondes utilise la DNase I pour introduire des bris dans l'ADN référence créant ainsi des sites d'attache pour la polymérase. Parmi les sondes créées, certaines peuvent donc être plus longues puisqu'elles ne sont pas reliées à la présence d'un site d'attache d'amorce. Néanmoins, bien que les sondes ainsi générées soient plus longues, les résultats sont demeurés négatifs. Puisque toutes les séquences isolées étaient dans le 3'-UTR (*untranslated region*) des ARNm, il est possible que la présence importante de bases A et T dans cette région fasse en sorte qu'elles se détachent plus facilement.



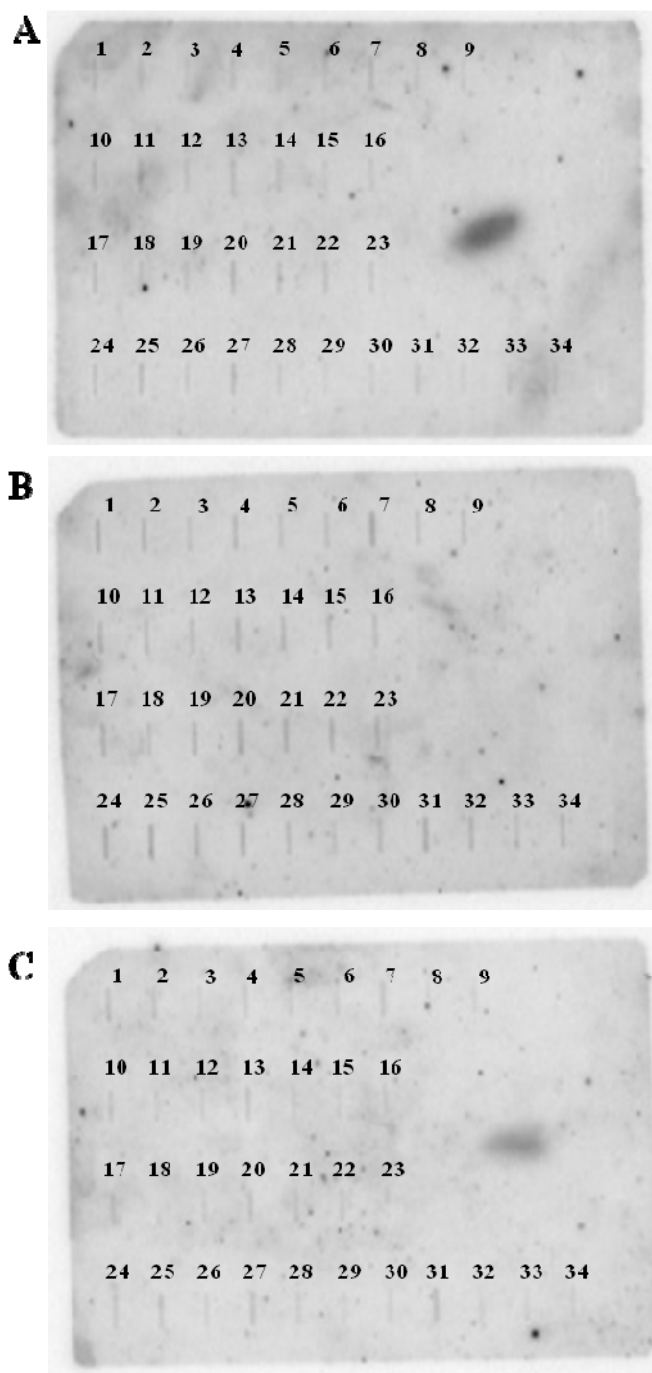
**Figure 5.7** Analyse Northern de huit candidats de gènes induits au froid. Pour chacune des sondes, trois conditions expérimentales étaient testées. 1.- Contrôle 27 °C 2.- Induction 6H 12°C 3.- Induction 6H 18 °C. **A)** Candidat A3 **B)** Candidat A4 **C)** Candidat G1 **D)** Candidat G2 **E)** Candidat G4 **F)** Candidat G5 **G)** Candidat G6 **H)** Candidat G7.



Une approche inverse a par la suite été tentée. Au lieu de fixer les ARNm sur une membrane et d'hybrider avec des sondes mises au point à partir de fragments PCR correspondant aux candidats, les fragments PCR ont été fixés sur membranes et hybridés avec des sondes obtenues à partir des ARNm. L'analyse Northern inverse a donc permis de vérifier les 34 candidats en même temps sur une même membrane. Trois membranes identiques, une hybridée par condition (témoin 27°C, induction 12°C 6 heures et induction 18°C 6 heures), ont été préparées (Figure 5.8). Puisque les sondes étaient synthétisées à l'aide d'un oligo-dT<sub>20</sub>, elles devaient théoriquement couvrir les régions 3'-UTR des ARNm d'où proviennent nos candidats. Malheureusement, les résultats n'ont pas permis de discriminer les candidats puisque, pour chaque candidat, le signal obtenu sur les trois membranes était similaire. De plus, la présence d'un bruit de fond différent pour chacune des membranes a compliqué l'analyse. La figure 5.8 présente les résultats obtenus pour le deuxième essai de Northern inverse, le premier n'ayant donné pratiquement aucune bande. À la lumière de ces résultats, aucun candidat n'a pu être sélectionné pour tenter d'isoler son promoteur.

#### 5.3.4 Analyse qPCR

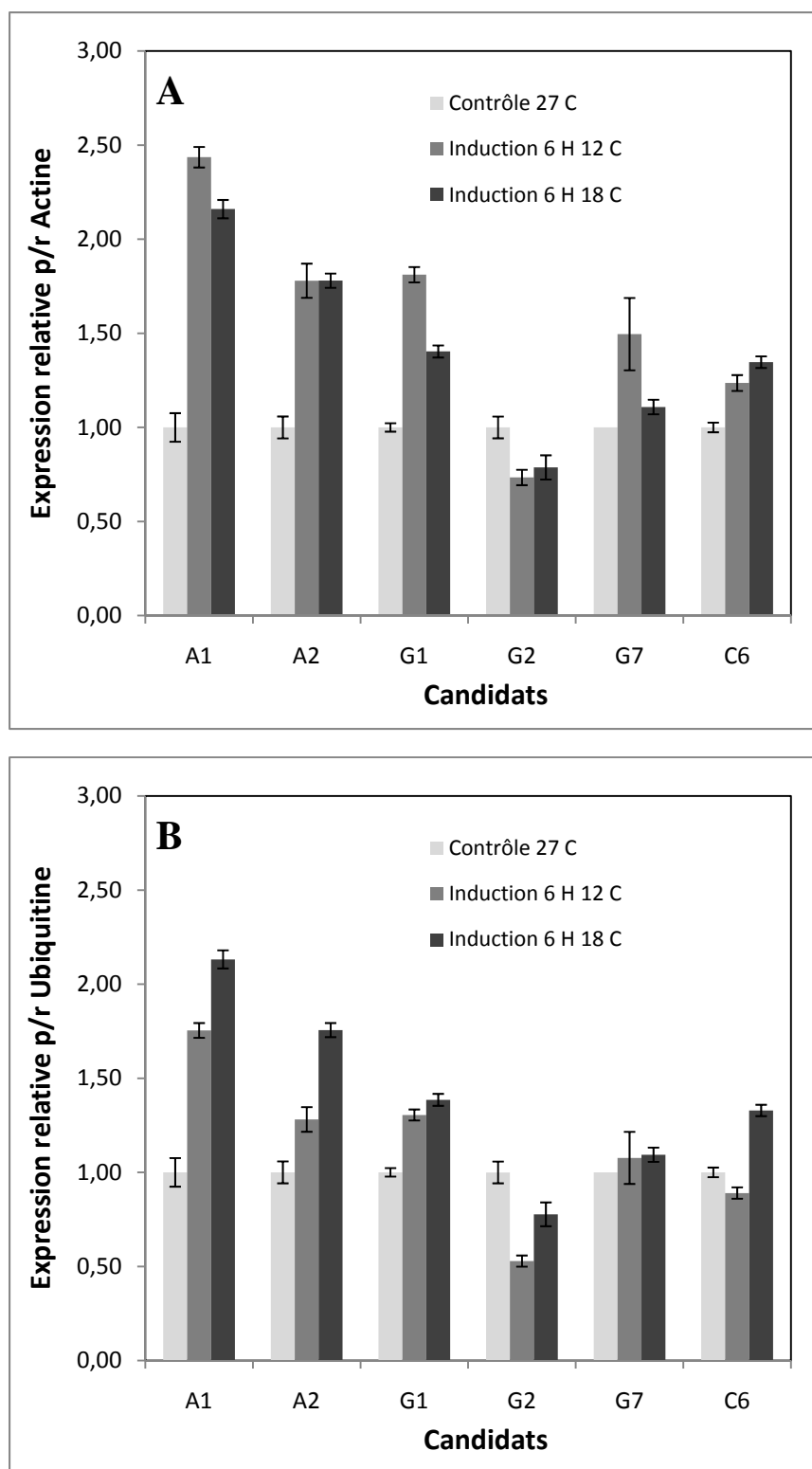
Après ces analyses Northern et Northern inverse non concluantes, une troisième approche a été tentée afin de vérifier le potentiel d'induction au froid des candidats isolés lors de l'analyse d'expression différentielle. Un PCR quantitatif (qPCR) a été effectué sur six candidats (A1, A2, G1, G2, G7 et C6). La figure 5.9 présente les résultats obtenus normalisés par rapport aux gènes de l'actine (A) ou de l'ubiquitine (B). En général, lorsque les candidats sont exposés à 12°C ou 18°C, les hausses d'expression sont assez faibles et ne dépassent pas 2.5 fois. Dans le cas du candidat G2, on observe même une baisse d'expression. Idéalement, les promoteurs recherchés s'exprimeraient très peu en condition normale et auraient un fort potentiel d'induction



**Figure 5.8** Analyse Northern inversée (Reverse Northern) de tous les candidats de gènes induits au froid. **A.** Contrôle 27 °C **B.** Induction 6H 12°C **C.** Induction 6H 18 °C. **1.** A1 **2.** A2 **3.** A3 **4.** A3\* **5.** A4 **6.** A5. **7.** A6 **8.** A7 **9.** A7\* **10.** G1 **11.** G1\* **12.** G2 **13.** G3 **14.** G4 **15.** G4\* **16.** G5

17. G5\* 18. G6 19. G7 20. G7\* 21. **G7\*\*** 22. G8 23. G8\* 24. C1 25. C1\* 26. C2 27. C3

28. C4 29. C4\* 30. C5 31. C6 32. C6\* 33. C7 34. C7\*



**Figure 5.9 Analyse qPCR** 1.- Contrôle 27 °C 2.- Induction 6H 12°C 3.- Induction 6H 18 °C.

lorsqu'exposés au froid. D'après ces résultats, aucun des candidats obtenus par représentation différentielle des ARNm ne démontrait un tel profil.

### 5.3.5 Analyses BLAST

Une première analyse BLAST avait initialement été réalisée après l'obtention des séquences des candidats, mais aucune similitude significative n'avait été trouvée puisque les bases de données génomiques sur les plantes sont généralement moins complètes que celles sur les humains ou autres systèmes modèles (bactéries, levures).

Plusieurs mois après la première analyse, une seconde tentative a été réalisée. Pour ce faire, trois banques de données publiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) ont été criblées (Séquences nucléotidiques, séquences d'ARN messagers et Banque « *Expressed Sequenced Tags* » non-humain et non-souris) avec deux critères de sélection (séquences très similaires et séquences assez similaires). Le tableau 5.2 présente un résumé de ces résultats en donnant la séquence ayant la meilleure similitude avec celle du candidat. Ainsi, quatre candidats (A1, A2, A3 et G8) ont montrés une similitude pour une séquence tirée de *N. tabacum* exposé une nuit à 4°C. Il s'agit donc de candidats potentiellement induits au froid et qui seront utilisés pour le 5'-RACE *Rapid Amplification of cDNA Ends*. Les résultats présentés au tableau 5.2 sont issus d'une analyse réalisée à l'été 2009; précédemment, l'analyse avec les candidats A7 et A7\* ne donnaient aucun résultat positif ce qui explique pourquoi ils n'ont pas été conservés pour la suite des expériences. Les candidats A1 et A2 étant les plus prometteurs parmi ceux analysés par qPCR, les résultats du BLAST étaient confirmés.

**Tableau 5.2. Résumé des résultats obtenus avec les analyses BLAST**  
**des fragments obtenus par *Differential Display***

Candidats	Blast 1	Blast 2	Blast 3	Blast 4	Blast 5	Blast 6
A1	N.D.	<i>S. tuberosum</i> patatin-rich BAC	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> seedling library
A2	N.D.	<i>S. lycopersicon</i> chromosome 6	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> clone BY5709	<i>N. tabacum</i> cold AM824768
A3	N.D.	<i>N. tabacum</i> repetitive DNA	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> cold AM807111
A3*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A4/A5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A7	N.D.	<i>N. tabacum</i> rbcMT-T gene	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> cold AM830057
A7*	N.D.	<i>S. melongena</i> BAC 77N19	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> cold AM833935	
A8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G1*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> clone BY13334	
G2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Secale cereal anther cDNA
G4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> AM785536
G4*	N.D.	<i>S. lycopersicon</i> chromosome 3	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> clone BY3790
G5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G5*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G7*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G7**	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> nt005118003	
G8	N.D.	N.D.	N.D.	<i>A. niger</i> An12g06 240	N.D.	<i>N. tabacum</i> cold AM789447
C1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> AGN_RNC009x
C1*	<i>V. vinifera</i> VV78X032611		<i>B. Taurus</i> fucosidase		<i>B. Taurus</i> LB02244.CR	
C3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C4	<i>P. chrysogenum</i> Pc00c22		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C4*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C6	<i>N. sylvestris</i> chloroplast DNA		<i>R. communis</i> mRNA		<i>P. americana</i> flower cDNA	
C6*	N.D.	<i>S. lycopersicon</i> chromosome 8	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> clone BY11631
C7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> clone BY2472
C7*	<i>B. rapa</i> clone KBrB010H02		<i>C. familiaris</i> mRNA		<i>B. napus</i> leaf cDNA 017826	
C8	<i>L. infantum</i> chromosome 20		<i>Z. mays</i> LOC 100273113		<i>Daphnia pulex</i> cDNA	

### 5.3.6 5'-RACE

À la lumière des résultats d'analyse BLAST, quatre candidats (A1, A2, A3 et G8) se sont montrés plus intéressants que les autres en raison de leur similitude de séquence avec des gènes de *N. tabacum* induits lorsque des plants étaient exposés une nuit à 4°C. Puisque le but est d'isoler des promoteurs inductibles au froid, il était essentiel d'obtenir la séquence 5' des gènes d'où les séquences des candidats sont issues. Les résultats des analyses BLAST n'ont pu permettre ceci puisqu'elles étaient elles-mêmes très courtes (EST : *Express Sequence Tags*). Il était donc nécessaire d'utiliser une méthode, le 5'-RACE, c'est-à-dire une méthode d'amplification rapide du bout 5' des ADNc. Pour ce faire, trois amorces spécifiques à chacun des candidats ont été synthétisées. La première a été utilisée pour convertir les ARNm en ADNc alors que les deux autres ont servi aux rondes d'amplification. En effet, puisque dans bien des cas, les ARN correspondant au gène intéressants sont peu nombreux, il peut être nécessaire de faire deux amplifications avant d'obtenir des bandes. La particularité de la méthode RACE est l'ajout de cytosines en 5' de l'ADNc permettant un second site d'appariement pour une amorce rendant ainsi possible l'amplification PCR.

Pour chacun des candidats, les 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> PCR ont été réalisées avec les amorces spécifiques numéro 2 et 3 respectivement. Plusieurs bandes peuvent ainsi être observées autant pour le 1<sup>er</sup> PCR que le second. Puisque le second PCR est niché, les bandes observées devraient être avoir une taille légèrement inférieure à celles du premier PCR. Dans un premier temps, les bandes ayant une taille supérieure à 800 pb ont été extraites à l'aide d'un kit *Gel extraction*, clonées dans le vecteur TOPO, et utilisées pour une transformation. Malheureusement, probablement en raison du faible rendement de récupération de l'ADN, les transformations n'ont pas fonctionnées. Une seconde transformation a donc été tentée en clonant cette fois, l'ensemble des produits PCR non-

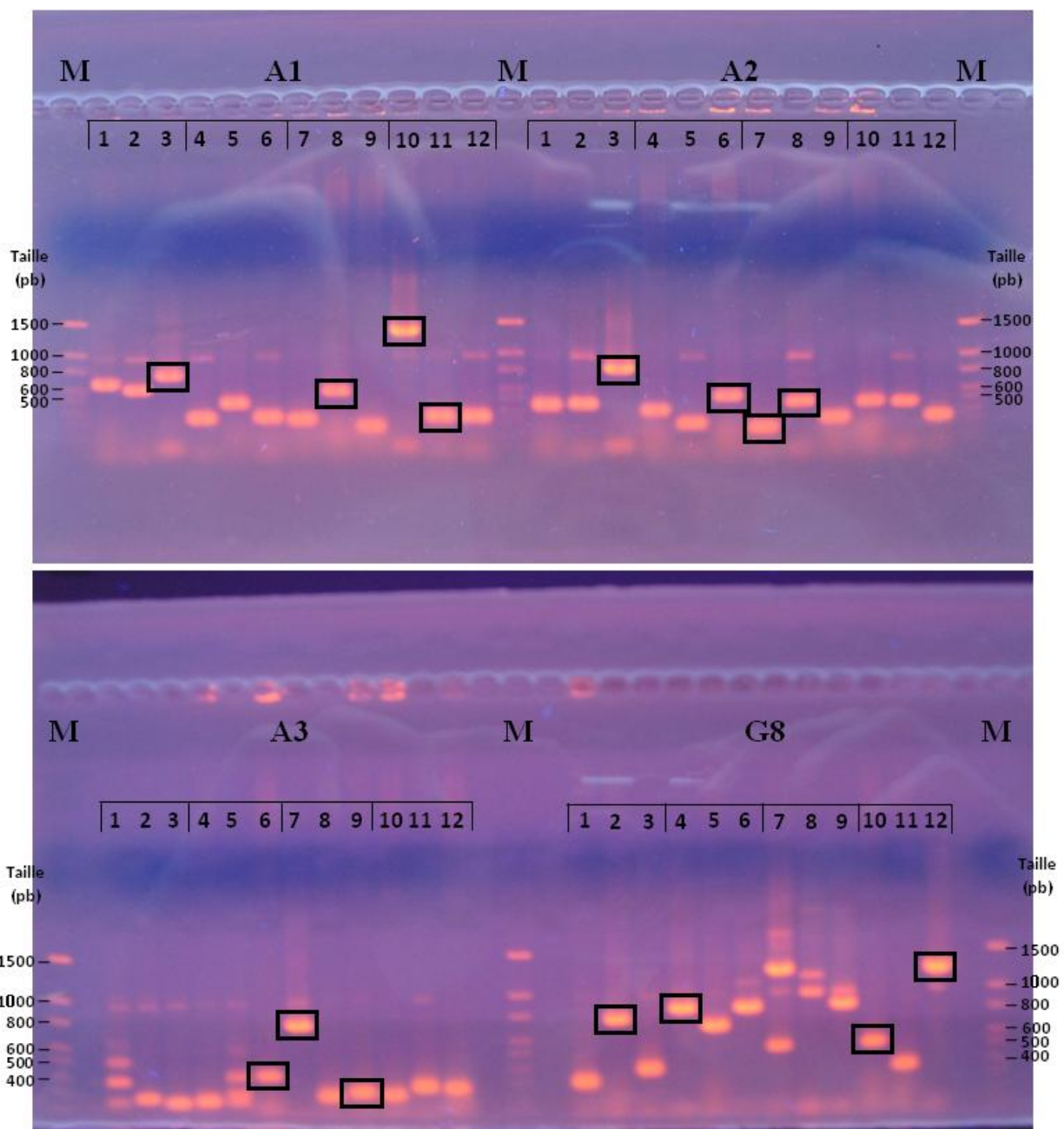
purifiés dans le vecteur TOPO. Pour chacune des transformations, plusieurs colonies ont pu être observées. Pour chacun des candidats, les fragments clonés dans douze colonies distinctes ont été comparés grâce un PCR effectué directement sur les colonies. Puisque les colonies avaient incorporé des fragments de taille diverses, les quatre fragments de plus grande taille ont été sélectionnés pour être séquencés. Les colonies choisies étaient celles où une bande unique était présente. Les séquences de ces fragments sont données en Annexe 3. En raison de l'utilisation des amorces T3 et T7 qui se trouvent dans le vecteur pour l'amplification de la figure 5.10, la taille de la séquence isolée par le 5'-RACE est d'environ 150 pb inférieure à celle sur le gel. La taille exacte pour chacun des clones est indiquée au tableau 5.3.

Parmi les quatre clones pour le candidat A1, les deux clones les plus longs (3 et 10) ont été obtenus par une amplification utilisant uniquement l'amorce UAP. Par conséquent, il n'y a aucune chance que ces fragments correspondent au candidat A1. Les résultats du BLAST présentés en version abrégée au Tableau 5.4 confirment ceci en montrant une forte affinité pour les séquences des ARN ribosomiaux de *N. tabacum*. Le clone 8 montre lui aussi une similitude de séquence avec les ARN ribosomiaux de *S. cernuus*, mais également de *N. tabacum*. Dans la banque d'ESTs, il est toutefois similaire à un ADNc isolé de *N. tabacum*. Bien que la séquence obtenue avec le 5-RACE soit identique à ce clone, lorsqu'elle est jointe à la séquence isolée lors du *differential display* la similitude s'arrête. Ceci suggère donc que la séquence isolée avec le 5'-RACE n'est pas la continuité de celle obtenue précédemment. Comme elle ne correspond pas au candidat intéressant pour l'isolement du promoteur, ce clone doit être rejeté. Le clone 11 a lui aussi une similitude avec des ARNm de *N. tabacum*, mais comme dans le cas du clone 8, aucun résultat n'englobe la séquence obtenue par le *differential display* et le 5'-RACE. Il doit donc également être rejeté.



**Tableau 5.3 Résumé des tailles des fragments isolés lors  
des analyses 5'-RACE**

<b>Candidat A1</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Candidat A2</b>	<b>Taille (pb)</b>
Clone 3	578	Clone 3	561
Clone 8	346	Clone 6	287
Clone 10	1093	Clone 7	60
Clone 11	132	Clone 8	255
<b>Candidat A3</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Candidat G8</b>	<b>Taille (pb)</b>
Clone 6	181	Clone 2	537
Clone 7	537	Clone 4	631
Clone 9	45	Clone 10	301
		Clone 12	1020



**Figure 5.10. Amplification PCR sur colonies des fragments insérés dans le vecteur TOPO avec les amorces T3/T7.** Pour chaque candidat, 12 colonies ont été testées. Les fragments encadrés correspondent aux vecteurs séquencés.

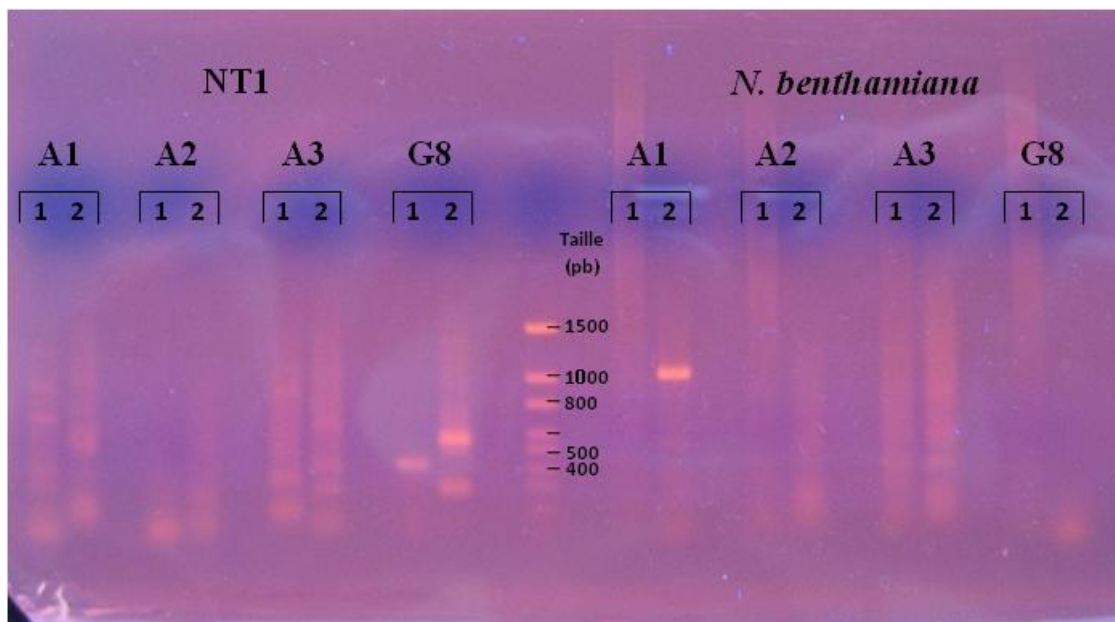
Le clone 3 du candidat A2 est également rejeté puisqu'il s'agit d'un fragment amplifié avec l'amorce UAP uniquement. Le clone 6 ayant une similitude de séquence avec les ARN ribosomiaux 26S l'est également. Bien que les clones 7 et 8 démontrent une similitude de séquences avec des clones d'ARNm de *N. tabacum*, encore une fois aucun ne correspond à la séquence 5' de nos candidats.

En ce qui concerne le candidat A3, seulement trois clones différents ont pu être isolés et séquencés. Le clone 6 a une similitude de séquence avec un gène de *N. tabacum* pour la multiplication des tobavirus et un clone d'ARNm également de *N. tabacum*. Toutefois, les séquences appariées ne concernent que celle du fragment 5'-RACE; le clone doit donc être rejeté. L'analyse BLAST sur la banque de séquences nucléotidiques démontre que le clone 7 est similaire à une séquence d'ADN répétitive de *N. tabacum*. Toutefois, cette séquence correspondait au fragment isolé lors du *differential display*. À l'inverse, l'appariement observé lors du BLAST de la banque d'EST est uniquement dû au fragment isolé lors du 5'-RACE. Finalement, le clone 9 est tellement court (45 pb) que les résultats obtenus ne correspondent qu'au fragment du *differential display*.

Pour le dernier candidat, G8, tous les clones qui ont été isolés provenaient du premier PCR effectué avec la seconde amorce. Malheureusement, aucun des candidats ne présentait le bout de séquence correspondant à la troisième amorce qui aurait validé le clone. Les clones 2, 10 et 12 ont des tailles de séquence différentes, mais correspondent tous au même gène; un gène d'ADN mitochondrial ou de trichomes de *N. tabacum*. Le clone 4 est quant à lui légèrement différent, mais correspond aussi à de l'ADN mitochondrial.

**Tableau 5.4 Résumé des résultats obtenus avec les analyses BLAST  
des fragments obtenus par 5'-RACE**

Candidats	BLAST # 1	BLAST # 2	BLAST # 3	BLAST # 4	BLAST # 5	BLAST # 6
<b>A1 # 3</b>	<i>N. tabacum</i> 26S ribosomal mRNA		<i>Vitis vinifera</i> misc RNA		<i>N. tabacum</i> EST2010 CaCIPK6T181	
<b>A1 # 8</b>	<i>S. cerevisiae</i> 26S rRNA		<i>Z. mays</i> hypothetical protein mRNA		<i>N. tabacum</i> AGN_PNL216bf mRNA	
<b>A1 # 10</b>	<i>N. tabacum</i> ribosomal protein L3A mRNA		<i>R. communis</i> 60S ribosomal prot. L3 mRNA		<i>N. tabacum</i> mRNA KG9B.001K11	
<b>A1 # 11</b>	N.D.	<i>S. tuberosum</i> patatin-rich BAC 14K07	N.D.	N.D.	<i>N. tabacum</i> AGN_RNC110 xa22f1	<i>N. tabacum</i> seedling library AM809971
<b>A2 # 3</b>	<i>N. tabacum</i> 26S ribosomal mRNA		<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein mRNA		<i>N. tabacum</i> AGN_RNC004 xk13f1	
<b>A2 # 6</b>	<i>N. tabacum</i> clone CD40 26S ribosomal mRNA		<i>Vitis vinifera</i> misc RNA		<i>N. tabacum</i> UFRST108 root / stem cDNA	
<b>A2 # 7</b>	<i>S. lycopersicon</i> Chromosome 6 C06SLm0060E11		<i>Candida dubliniensis</i> CD36		<i>N. tabacum</i> clone KR3B.106E17	
<b>A2 # 8</b>	<i>S. lycopersicon</i> Chromosome 6 C06SLm0060E11		<i>Caenorhabditis briggsae</i> protein CBG09401		<i>N. tabacum</i> clone KR3B.106E17	
<b>A3 # 6</b>	<i>N. tabacum</i> Tobamavirus Multiplication 3		<i>Trypanosoma cruzi</i> retrotransposon hot spot		<i>N. tabacum</i> clone KT7C.110N15F	
<b>A3 # 7</b>	<i>N. tabacum</i> repetitive genomic DNA		<i>Branchiostoma floridae</i> 200940 hypothetical RNA		<i>N. tabacum</i> AGN_ELPO12 xf05f1.ab1	
<b>A3 # 9</b>	<i>N. tabacum</i> repetitive genomic DNA		<i>Trypanosoma cruzi</i> retrotransposon hot spot		<i>N. tabacum</i> cold library AM807111	
<b>G8 # 2</b>	<i>N. tabacum</i> mitochondrial DNA		<i>Oriza sativa</i> mRNA Os01g0790200		<i>N. benthamiana</i> trichomes NBT063_G08_026	
<b>G8 # 4</b>	<i>N. tabacum</i> mitochondrial DNA		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>G8 # 10</b>	<i>N. tabacum</i> mitochondrial DNA		<i>Drosophila melanogaster</i> mRNA CG10062		<i>Solanum lycopersicon</i> LET068_A01_008	
<b>G8 # 12</b>	<i>N. tabacum</i> mitochondrial DNA		<i>Zea mays</i> protein LOC100274466		<i>N. benthamiana</i> EST746580	



**Figure 5.11. Résultats des premier et deuxième PCR du deuxième essai de RACE pour les quatre candidats ayant montré une similitude par analyse BLAST avec des gènes induits au froid.**

Puisque tous les résultats obtenus lors de la première analyse RACE se sont avérés non-concluants, une seconde analyse a été tentée en utilisant cette fois un oligo dT lors de la synthèse de l'ADN complémentaire en remplacement de l'amorce spécifique numéro 1. Les premier et second PCR ont ensuite été réalisées avec les amorces spécifiques 1 et 2. De cette façon, parmi les résultats de BLAST, les clones isolés pourraient être validés en vérifiant la présence du site de l'amorce 3. De plus, les PCR ont été réalisés en parallèle avec des ARN extraits de *N. tabacum* NT1 et *N. benthamiana* exposés au froid. Une lignée de *N. benthamiana* est présentement en développement au laboratoire. Comme cette dernière est apparentée à *N. tabacum*, les PCR ont été tentés. Les résultats sont présentés à la figure 5.11.

En ce qui concerne NT1, les candidats A1, A3 et G8 ont donné des bandes, mais la présence de produits non spécifiques est très fréquente. Dans le cas du candidat A2, aucune amplification n'a pu être observée. Seul le candidat G8 présente des bandes assez fortes pour être cloné. En ce qui concerne les PCR effectuées avec les ARN de *N. benthamiana*, à l'exception du candidat A1, aucune n'a fonctionné. En effet, la seconde PCR effectuée sur le candidat A1 est la seule à présenter une bande forte. Plusieurs tentatives ont été réalisées pour tenter de cloner les bandes des secondes PCR NT1-G8 et *N. bentha*-A1 dans le vecteur TOPO, mais aucune n'a fonctionné. Ces fragments n'ont donc malheureusement pu être séquencés ni analysés.

#### **5.4. Conclusion**

Initialement, le projet d'identification et d'isolement de promoteurs inductibles semblait réalisable à moyen terme. Toutefois, en raison des multiples problèmes rencontrés et du peu d'information disponible dans les banques de données publiques, ce volet n'a pu être complété sur la durée de cette thèse. Parmi les 34 candidats initialement identifiés par l'analyse

différentielle, la sélection actuelle des candidats A1, A2, A3 et G8 demeure encore principalement basée sur les résultats des analyses BLAST et n'a pu être validée autrement. Les tentatives de 5'-RACE pour déterminer la séquence en amont de ces candidats se sont révélées infructueuses. Ces séquences auraient pu être utilisées pour refaire les analyses Northern et ainsi confirmer l'induction de ces gènes avant de tenter d'isoler leur promoteur par marche chromosomique. Au cours du projet, les banques de données disponibles se sont enrichies puisque initialement, les analyses BLAST ne donnaient pas de résultats positifs et quelques mois plus tard, il en fut autrement. On peut donc supposer que d'ici quelques temps, une nouvelle analyse pourrait donner des résultats où les candidats présenteraient une similitude avec des séquences beaucoup plus longues; permettant ainsi d'avoir la séquence complète du gène d'où ils sont issus. Entre-temps, l'optimisation des conditions PCR utilisées lors des RACE pourrait possiblement permettre d'obtenir des bandes mieux définies et de taille supérieure. Aussi, l'utilisation des ARNm uniquement au lieu des ARN totaux éviterait la formation d'amplicons issus des ARN ribosomiaux.

Depuis peu, une alternative à la méthodologie adoptée est disponible. En effet, à la fin de 2008, Agilent a mis sur le marché une biopuce (*microarray*) permettant l'analyse simultanée de 43 803 gènes de *Nicotiana tabacum* (cat # G2519F). Les sondes de ces biopuces ont été synthétisées à l'aide des données des banques d'Unigene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene)), de TIGR (*The Institute for Genomic Research*, <http://www.tigr.org/db.shtml>) et d'IGR *Plant transcript Assemblies* (<http://plantta.jcvi.org/>). Grâce à cet outil de criblage à haut débit, il serait sans doute possible de rapidement identifier plusieurs gènes candidats inductibles au froid. De plus, comme toutes les sondes sont issues de gènes ou d'ARNm contenus dans les bases de données, la

procédure permettant l'isolement des promoteurs serait simplifiée. Il s'agit donc d'une avenue prometteuse pour la poursuite de ce projet.

Ce volet a originellement été initié avant le volet sur la coculture décrit au Chapitre 4. Par conséquent, les candidats ont été identifiés chez *N. tabacum* et non *N. benthamiana*. Toutefois, ces deux espèces étant très apparentées, les promoteurs qui seraient isolés grâce aux données partielles récoltées dans ce volet devraient pouvoir s'exprimer de façon similaire chez *N. benthamiana*.



## CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Comme il a été précisé antérieurement, un des défis majeurs en ce qui concerne l'utilisation industrielle d'une plateforme végétale *in vitro* pour la production de protéines recombinantes consiste en l'amélioration des rendements normalement obtenus avec cette plateforme. Plusieurs avenues prometteuses, telles que l'amélioration des cassettes d'expression, l'utilisation de vecteurs viraux et l'optimisation des paramètres des procédés de culture et de récupération des protéines recombinantes ont été décrites dans la revue de littérature présentée au chapitre 2. Parmi toutes ces approches, cette thèse s'est concentrée sur deux approches distinctes mais potentiellement complémentaires, à savoir l'utilisation d'un suppresseur viral en coculture et l'identification de nouveaux promoteurs forts inductibles au froid. Alors que la première a été un succès, les résultats obtenus avec la seconde approche demeurent toutefois incomplets.

Les suppresseurs viraux sont couramment utilisés lors de l'agroinfiltration de feuilles pour augmenter les rendements en protéines recombinantes. Toutefois, aucune étude n'avait démontré leur utilisation dans un procédé transitoire avec des cellules de plantes en suspension. En s'appuyant sur les travaux de Andrews et Curtis (2005) qui démontraient la faisabilité de produire une protéine d'intérêt en cocultivant des cellules de plantes avec une lignée d'*Agrobacterium* contenant un vecteur d'expression, un système similaire a été développé pour vérifier la possibilité de transformer les cellules de plantes avec plusieurs constructions (i.e. distribuées dans plusieurs *Agrobacterium*) simultanément. Des cellules de *N. benthamiana* ont donc été cocultivées avec deux souches d'*Agrobacterium*, l'une contenant un vecteur pour l'expression des chaînes lourde et légère d'un IgG1 de souris et l'autre, un vecteur pour l'expression du suppresseur viral p19. Afin de vérifier que les cellules de plantes étaient effectivement

transformées par les deux bactéries et exprimaient les transgènes, une analyse quantitative des ARNs messagers de la chaîne lourde de l'IgG1 et du suppresseur viral a été réalisée. Il a ainsi pu être observé que la cotransformation des cellules était bien possible et que dans ce cas précis, la hausse de la productivité observée dans le groupe avec p19 versus celui avec uniquement la souche pour l'IgG1 pouvait être attribuée à la présence du suppresseur viral. Ceci suggère donc qu'il serait possible de transformer les cellules de plantes avec plusieurs constructions pour, par exemple, introduire un gène supplémentaire pour modifier la glycosylation de la protéine d'intérêt (Kim et al., 2008) ou tenter d'améliorer les rendements avec une coexpression d'un inhibiteur de protéase (Vézina et al., 2009) ou d'un suppresseur viral (Voinnet et al., 2003).

La présence du suppresseur p19 a donc permis d'augmenter la production de l'IgG1 intracellulaire d'environ 75 % (1,06 mg IgG1 avec p19/kg FW versus 0,6 mg /kg) au jour 9 de la coculture, mais les rendements globaux demeurent faibles. Les autres plateformes (bactéries, levures et cellules de mammifères) ont toutes un rendement de l'ordre du g/L ce qui en fait peut se traduire par un ratio d'environ 1 pour 1000. Dans le cas des tests de coculture, les rendements étant de l'ordre du mg/L, le ratio actuel entre la protéine d'intérêt et le reste des constituants cellulaires est 1000 fois plus petit. Par conséquent, les coûts de purification pour l'isolation de ces protéines seraient considérables. Normalement, la construction génétique codant pour l'IgG1 devait le diriger vers les voies de sécrétion pour pouvoir être récolté dans le milieu de culture. Toutefois, les rendements observés dans le milieu de culture sont de l'ordre du µg par L. Puisque qu'une quantité significative d'IgG1 a été trouvée dans les cellules, il est possible de poser deux hypothèses. La première suggère que les faibles niveaux observés dans le milieu sont possiblement causés par une dégradation rapide de l'IgG1 possiblement causée par la présence des bactéries. La seconde propose quant à elle qu'en raison d'un encombrement stérique généré

par la paroi cellulaire, une bonne partie de la protéine d'intérêt a été retenue dans les cellules en raison de grande taille. Les données actuelles ne nous permettent toutefois pas de conclure à aucune de ses hypothèses. Ce point mérite tout de même une attention particulière puisque si toutes les protéines d'intérêt étaient relarguées dans le milieu de culture, elles pourraient être récoltées en continue de manière à réduire leur temps de résidence dans le bioréacteur et d'ainsi éviter leur dégradation. Par conséquent, les étapes de purification en seraient grandement simplifiée et de même que les coûts qui leur sont associés.

Une lignée de *N. benthamiana* exprimant p19 de façon constitutive avait également été développée et cocultivée avec la souche d'*Agrobacterium* contenant le vecteur pour l'IgG1. Toutefois, les rendements d'IgG1 obtenus ont été plus faibles que ceux obtenus avec la lignée parentale de *N. benthamiana* en absence du suppresseur viral. L'expression constitutive de p19, une protéine virale, a possiblement un effet négatif sur le métabolisme cellulaire ce qui explique en partie les faibles rendements. Le niveau d'expression de p19 dans la lignée stable, bien que constant, est plus faible que ce qui est observé dans les tests d'expression transitoire en coculture. Puisque l'effet suppressif de p19 nécessite un niveau critique d'expression, il est possible que ce niveau n'ait pas été atteint dans la lignée stable. Une approche transitoire comme celle utilisée dans les travaux de cette thèse devrait donc être favorisée lors que le suppresseur viral p19 est utilisé afin de maximiser son efficacité. Toutefois, il est bien de mentionné que la lignée stable p19 utilisée était hétérogène et que si un criblage était effectué, il pourrait être possible d'isoler une lignée exprimant fortement p19. L'approche transitoire est toutefois attrayante en raison de sa facilité et de sa rapidité d'exécution.

L'intérêt de développer un tel système d'expression transitoire pour les cellules de plante vient principalement de la facilité avec laquelle il serait possible de passer à une échelle

industrielle. En effet, il est déjà possible de cultiver des cellules de plantes dans un bioréacteur ayant une taille de 75 000 L et même plus (Ritterhauss et al., 1990). Comme le vecteur de transformation (*Agrobacterium*) est autorépliatif, un faible inoculum pourrait être nécessaire pour transformer un bioréacteur en entier. Si on compare avec un procédé transitoire réalisé avec des cellules de mammifères, un des facteurs limitants provient des vecteurs de transformation. En effet, pour modifier des milliers de litres de cellules de mammifères, il est essentiel de préparer des grammes de vecteurs d'expression purifiés ce qui se traduit par des coûts de main d'œuvre et de purification considérables en plus de ralentir le procédé.

Le second volet de cette thèse a quant à lui porté sur l'amélioration des vecteurs d'expression. Les cassettes d'expression sont constituées de plusieurs éléments tels que les régions non traduites 5' et 3', le promoteur et la séquence du gène d'intérêt. Chacun de ces éléments a un impact sur le niveau d'expression du gène d'intérêt et peut être optimisé à sa façon. Les recherches effectuées dans ce volet se sont toutefois concentrées sur les promoteurs. Les promoteurs sont responsables du contrôle de l'expression de gènes et peuvent être constitutifs ou inductibles. Dans une optique de production industrielle, l'usage de promoteurs inductibles est souvent favorisé puisqu'ils permettent de séparer les phases de croissance cellulaire et de production. Différents stress peuvent être utilisés pour initier l'expression de gènes sous ces promoteurs. Ils peuvent être induits chimiquement ou à l'aide de stress métaboliques ou abiotiques tels que la lumière ou température. Dans le cadre de ce volet, les recherches effectuées ont tenté d'identifier et d'isoler des promoteurs inductibles au froid chez *Nicotiana tabacum*. Puisqu'il a été rapporté qu'un tel stress pouvait permettre d'améliorer la qualité et la quantité des protéines recombinantes, il s'agissait d'une avenue intéressante (Fogolin et al., 2004; Mujacic et al., 1999; Schatz et al., 2003). De plus, l'utilisation d'un stress au froid à

l'échelle industrielle est envisageable puisque la température est en général un paramètre facilement contrôlable. De plus, l'abaissement de la température des cellules de plantes cultivées *in vitro* serait avantageux puisqu'il contribuerait à augmenter la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture et d'ainsi réduire la quantité de mousse formée en diminuant le bullage nécessaire pour oxygéner les cellules.

Bien que certaines étapes aient été franchies et que quelques fragments de gènes intéressants aient été identifiés et isolés, le clonage et l'exploitation de promoteurs inductibles au froid n'ont pu être réalisés. Bien qu'entre le début de ce doctorat en 2004 et aujourd'hui, les banques de données disponibles sur les plantes se soient grandement améliorées, aucune similitude significative n'a pu être trouvée avec les fragments isolés. On peut donc supposer que lorsque les bases de données seront plus complètes, les fragments obtenus lors des travaux effectués pourraient mener à l'identification de promoteurs intéressants. Une autre avenue serait de répéter l'expérience en utilisant les nouvelles biopuces développées par Agilent qui permettent l'analyse simultanée de 43 803 gènes de *N. tabacum*. Tous ces gènes ont été synthétisés à l'aide des banques de données actuelles ce qui implique que la séquence des candidats intéressants pourrait être connue. Cette méthode de criblage à haut débit pourrait donc permettre de rapidement identifier plusieurs gènes candidats inductibles au froid.

Les deux approches étudiées dans cette thèse ne sont pas totalement indépendantes. En effet, il serait possible de les combiner en utilisant un vecteur d'expression inductible au froid qui serait délivré dans les cellules de plante par *Agrobacterium* dans un procédé en coculture. Dans cette optique, le froid, en plus d'être l'inducteur pour la production des protéines recombinantes pourrait permettre de limiter la croissance bactérienne et d'ainsi prolonger la période de production en retardant les effets négatifs de la présence des bactéries.

## CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Parmi les plateformes de production de protéines recombinantes émergentes, la culture *in vitro* de cellules de plantes semble se distinguer pour ses faibles coûts ainsi que sa capacité à synthétiser des protéines complexes et glycosylées. Tel que mentionné dans la revue de littérature, plusieurs méthodes sont présentement en développement pour tenter de faire avancer nos connaissances sur cette plateforme et d'améliorer ses performances en terme de quantité, mais également de qualité de protéines produites. Cette thèse a permis de vérifier la possibilité de transformer des cellules de plante en culture *in vitro* avec plusieurs constructions simultanément et a tenté d'identifier et d'isoler des promoteurs inductibles au froid.

Bien qu'il soit en effet possible de transformer les cellules avec plusieurs souches d'*Agrobacterium*, les taux d'expression obtenus sont demeurés faibles et essentiellement reliés à l'intracellulaire. Les faibles rendements d'IgG1 observés dans le milieu peuvent possiblement s'expliquer soit par la dégradation de l'IgG1 dans le milieu ou tout simplement par le fait que cette protéine, en raison de sa forte taille, pourrait être retenue par la paroi cellulaire. Des tests pourraient donc facilement être faits pour vérifier ces hypothèses. En ce qui concerne la porosité de la paroi, elle pourrait être augmentée en ajoutant des enzymes telles des cellulases dans le bioréacteur ou en tentant de transformer des protoplastes (cellules de plante sans paroi cellulaire). Évidemment, ceci entraînerait une fragilisation des cellules et les conditions de culture devraient être adaptées en conséquence. Afin d'éviter la dégradation des protéines dans le milieu de culture, plusieurs composés peuvent être ajoutés pour soit stabiliser les protéines présentes (albumine, BSA, gelatine) ou pour inhiber l'action des protéases (inhibiteurs de protéases, EDTA) (voir section 2.2.3.5.2. pour la liste complète des additifs possibles et leurs effets). De

plus, il serait bien de faire un suivi de la concentration bactérienne dans le milieu de culture. En effet, la concentration de l'inoculum pourrait être augmentée ou diminuée afin de maximiser l'efficacité de transformation tout en limitant les effets dommageables sur les cellules.

La coculture avec le suppresseur viral p19 semble avoir augmenté les rendements, mais comme il était sur un vecteur différent du gène d'intérêt et que son effet positif sur la production de protéines recombinantes implique deux événements de transformation distincts, la hausse n'a pas été très importante. Afin d'éliminer le besoin de multiples transformations, une lignée exprimant p19 de façon stable avait été développée, mais les rendements obtenus par cette dernière ont été plus faibles que ceux de la double transformation. Toutefois, la lignée utilisée était hétérogène et par conséquent il est possible d'émettre l'hypothèse qu'un criblage aurait pu permettre l'isolement d'une lignée exprimant fortement p19 (en supposant qu'un niveau élevé de cette protéine virale ne soit pas léthal pour les cellules de plante). Une autre alternative, tel que récemment démontré par Sainsbury et al. (2009) serait d'utiliser un vecteur d'expression combinant le gène d'intérêt et le suppresseur viral. Ceci assurerait que les cellules transformées auraient nécessairement les deux gènes. Ces gènes pourraient également être sous le contrôle d'un promoteur inductif de façon à cibler la production sur quelques journées et d'ainsi augmenter les rendements.

Depuis le début de cette thèse en 2004, l'intérêt pour les vecteurs viraux s'est grandement accru et plusieurs vecteurs utilisant des éléments viraux (promoteurs, régions 5' et 3' non traduites) ont été développés. L'intérêt principal de ces systèmes est qu'ils permettent une forte transcription du transgène et mènent souvent à des rendements plus élevés que ceux obtenus avec des promoteurs de plante. On pourrait donc remettre en question l'intérêt de poursuivre les recherches pour

identifier des promoteurs de plante inductibles au froid. Une approche intéressante serait toutefois de combiner des éléments viraux sous le contrôle d'un promoteur inductible au froid. Plesha et al. (2007) ont développé un système similaire inductible au 17- $\beta$ -estradiol. Dans ce vecteur, le gène d'intérêt remplace ou est fusionné au gène codant pour la protéine de la capsid virale alors que la réplicase du virus est sous contrôle du promoteur inductible. Par conséquent, en présence de l'agent inducteur, la réplicase virale s'active et génère plusieurs copies du transgène. Selon cette approche, il serait possible d'obtenir une lignée stable de cellules de plantes ayant incorporé cette construction à son génome. On pourrait donc combiner les avantages d'un stress au froid pour les cellules de plantes tel que la formation de protéines recombinantes plus homogènes en ce qui concerne leur profil de glycosylation et une réduction des protéases et de la formation de mousse avec une forte expression du transgène grâce aux éléments viraux.



## BIBLIOGRAPHIE

- Achstetter T, Nguyen-Juilleret M, Findeli A, Merkamm M and Lemoine Y (1992) A new signal peptide useful for the secretion of heterologous proteins and its application for the synthesis of hirudin. *Gene* **110**:25-31.
- Agarwal S, Singh R, Sanyal I and Amla DV (2008) Expression of modified gene encoding functional human  $\alpha$ -1-antitrypsin protein in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* **17**:881-896.
- Agathos SN (1996) Insect cell bioreactors. *Cytotechnology* **20**:173-189.
- Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ and Smales CM (2005) The Cold-Shock Response in Cultured Mammalian Cells: Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering* **93**:829-835.
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH and März L (1999) Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **16**:109-123.
- Andrews LB and Curtis WR (2005) Comparison of Transient Protein Expression in Tobacco Leaves and Plant Suspension Culture. *Biotechnology Progress* **21**:946-952.
- Atkinson MM, Huang J-S and Knopp JA (1985) Hypersensitivity of suspension-cultured tobacco cells to pathogenic bacteria. *Phytopathology* **75**:1270-1274.
- Baneyx F (1999a) In vivo folding of recombinant proteins in *Escherichia coli*, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Davies JE, Demain, A.L., Cohen, G., Hershberger, C.L., Forney, L.J., Holland, I.B., Hu, W.S., Wu, J.H.D., Sherman, D.H., Wilson, R.C. ed) pp 551-565, Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Baneyx F (1999b) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**:411-421.

- Baneyx F and Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **22**:1399-1408.
- Baulcombe DC and Molnar A (2004) Crystal Structure of p19 - A Universal Suppressor of RNA Silencing. *TRENDS in Biochemical Science* **29**:279-281.
- Becker T, Hitzmann B, Muffler K, Pörtner R, Reardon KF, Stahl F and Ulber R (2007) Future Aspects of Bioprocess Monitoring. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **105**:249-293.
- Ben-Maimon C and Garnick R (2006) Biogenerics at the crossroads. *Nature Biotechnology* **24**:268-269.
- Bernard AR, Kost TA, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, Yahia-Cherif ZC, C. and Mills A (1994) Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: comparison with the baculovirus system. *Cytotechnology* **15**:139-144.
- Bethencourt V (2009) Virus stalls Genzyme plant. *Nature Biotechnology* **27**:681-681.
- Bonnet E, Van de Peer Y, Rouzé P. 2006. The small RNA world of plants. *New Phytologist* **171**(3):451-468.
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Peterson F, Gleba Y and Raskin I (1999) Production of recombinant proteins in plant roots exudates. *Nature Biotechnology* **17**:466-469.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D and Demeneix B (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**:7297-7301.
- Bretthauer RK and Castellino FJ (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30**:193-200.

- Brodersen P and Voinnet O (2006) The Diversity of RNA Silencing Pathways in Plants. *TRENDS in Genetics* **22**:268-280.
- Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JHW, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z and Koprowski H (2006) Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**:8804-8809.
- Cai Y, Sun J, Wang J, Ding Y, Tian N, Liao X and Xu W (2008) Optimizing the codon usage of synthetic gene with QPSO algorithm. *Journal of Theoretical Biology* **254**:123-127.
- Canto T, Uhrig JF, Swanson M, Wright KM, MacFarlane SA. 2006. Translocation of *Tomato bushy stunt virus* p19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its suppressor activity. *Journal of Virology* 80(18):9064-9072.
- Castilho LR, Anspach FB and Deckwer WD (2002) An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnology Progress* **18**:776-781.
- Chalmers JJ (1996) Shear sensitivity of insect cells. *Cytotechnology* **20**:163-171.
- Chan MT and Yu SM (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6543-6547.
- Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, Qi Q and Wang PG (2005) Modification of plant N-glycans processing: the future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Medicinal Research Reviews* **25**:343-360.
- Chew NJ (1993) Emerging technologies : transgenic therapeutics. *Biopharm* **6**:24-26.

- Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, Carrington JC and Dolja VV (2006) Diverse Suppressors of RNA Silencing Enhance Agroinfection by a Viral Replicon. *Virology* **346**:7-14.
- Cho JS, Hong SM, Joo SY, Yoo JS and Kim DI (2007) Cryopreservation of transgenic rice suspension cells producing recombinant hCTLA4Ig. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**:1470-1476.
- Choi B-K, Bobrowick P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S and Gerngross TU (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**:5022-5027.
- Choi JH and Lee SY (2004) Secretary and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**:625-635.
- Chou CP (2007) Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**:521-532.
- Chuck G, Candela H, Hake S. 2009. Big impact by small RNAs in plant development. *Current opinion in Plant Biology* 12(1):81-86.
- Chuck AS, Distler A, Sander SA, Deshpande RR, Nyberg G and Seely JE (2009) *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis*. Verlag, Switzerland.
- Chung IS, Taticek RA and Shuler ML (1993) Production of human alkaline phosphatase, a secreted, glycosylated protein from a baculovirus expression system and the attachment-dependent cell line *Trichoplusia ni* BTI-Tn 5B1-4 using a split-flow, air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress* **9**:675-678.
- Clements F and Bayer K (2006) Improvement of Bioprocess Monitoring: Development of Novel Concepts. *Microbial Cell Factories* **5**:1-11.

- Cloutier M, Bouchard-Marchand É, Perrier M and Jolicoeur M (2008) A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering* **99**:189-200.
- Cloutier M, Chen J, De Dobbeleer C, Perrier M and Jolicoeur M (2009) A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant Biotechnology Journal* (**in press**).
- Collens JI, Mason HS, Curtis WR. 2007. *Agrobacterium*-mediated viral vector-amplified transient gene expression in *Nicotiana glutinosa* plant tissue culture. *Biotechnology Progress* **23**(3):570-576.
- Collens JI, Lee DR, Seeman AM and Curtis WR (2004) Development of Auxotrophic *Agrobacterium tumefaciens* for Gene Transfer in Plant Tissue Culture. *Biotechnology Progress* **20**:890-896.
- Coloma MJ, Clift A, Wims L and Morrison SL (2000) The role of carbohydrate in the assembly and function of IgG1. *Molecular Immunology* **37**:1081-1090.
- Corrado G and Karali M (2009) Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnology Advances* **27**:733-743.
- Dale C, Allen A and Fogarty S (1999) *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm* **12**:36-42.
- De Dobbeleer C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R and Jolicoeur M (2006) A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Biotechnol Bioeng* **95**:1126-1137.
- De Wilde C, Van Houdt H, De Buck S, Angenon G, De Jager G and Depicker A (2000) Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of the transgene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**:347-359.
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J and Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology* **127**:852-862.

- Demain AL and Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* **27**:297-306.
- Dingermann T (2008) Recombinant Therapeutic Proteins: Production Platforms and Challenges. *Biotechnology Journal* **3**:90-97.
- Doran PM (1993) Design of reactors for plant cells and organs. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **48**:115-168.
- Doran PM (1999) Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspension in Stirred Reactors. *Biotechnology Progress* **15**:319-335.
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* **11**:199-204.
- Doran PM (2006a) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *TRENDS in Biotechnology* **24**:426-432.
- Doran PM (2006b) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *Journal of Biotechnology* **122**:39-54.
- Dowd JE, Kwok KE and Piret JM (2001) Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **75**:252-256.
- Drake PM, Chargelegue DM, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Obregon P and Ma JK (2003) Rhizosecretion of monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology* **52**:233-241.
- Durocher Y, Perret S and Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research* **30**:E9.

- Dyck MK, Gagné D, Ouellet M, Sénéchal J-F, Békanger E, Lacroix D, Sirard MA and Pothier F (1999) Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nature Biotechnology* **17**:1087-1090.
- Ecamilla-Trevino LL, Viader-Salvado JM, Barrera-Saldana HA and Guerrero-Olazarán M (2000) Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **22**:109-114.
- Edwards K, Johnstone C and Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**:1349.
- Eiteman MA and Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology* **24**:530-536.
- Elbers IJ, Stoopen GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJ, Bosch D and Lommen A (2001) Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous protein in tobacco leaves. *Plant Physiology* **126**:1314-1322.
- Evangelista RL, Kusnadi AR, Howard JA and Nikolov ZL (1998) Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant  $\beta$ -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress* **14**:607-614.
- Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E and Villaverde A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* **8**.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004) Plant-Based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:152-158.
- Fogolin MB, Wagner R, Etcheverrigaray M and Kratje R (2004) Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology* **109**:179-191.

- Fowler MW (1982) The large scale cultivation of plant cells. *Progress in Industrial Microbiology* **16**:207-229.
- Friedman B, Vaddi K, Preston C, E. M, Cataldo JR and McPherson JM (1999) A comparison of the pharmaceutical properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived  $\beta$ -glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood* **93**:2807-2816.
- Fuentes A, Ramos PL, Meilyn Rodriguez CA, Ramirez N and Pujol M (2004) Development of a highly efficient system for assessing recombinant gene expression in plant cell suspensions via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. *Biotechnol Appl Biochem* **39**:355-361.
- Fujita J (1999) Cold shock response in mammalian cells. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**:243-255.
- Fujita Y, Tohda H, Giga-Hama Y and Takegawa K (2006) Heat shock-inducible expression vectors for use in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research* **6**:883-887.
- Gallie DR, Tanguay RL and Leathers V (1995) The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* **165**:233-238.
- Ganapathi TR, Sunil Kumar GB, Srinivas L, Revathi CJ and Bapat VA (2007) Analysis of the limitations of hepatitis B surface antigen expression in soybean cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **26**:1575-1584.
- Gasser B and Mattanovich D (2007) Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale ? *Biotechnology Letters* **29**:201-212.
- Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N and Raskin I (2003) Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Reports* **21**:1188-1193.



- Geisse S and Henke M (2006) Large-scale transient transfection of mammalian cells: A newly emerging attractive option for recombinant protein production. *Journal of Structural and Functional Genomics* **6**:165-170.
- Gellison G, Janowick ZA, Weydemann U, Melber K, Strasser AWM and Hollenberg CP (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances* **10**:179-189.
- Gemmil TR and Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharides structure found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**:227-237.
- Gerngross TU (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **22**:1409-1414.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with non competing viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(40):14701-14706.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current opinion in Biotechnology* 18(2):134-141.
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette A-C, Bardor M, Pagnt S, Lerouge P and Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal* **2**:83-100.
- Gouka RJ, Punt PJ and van den Hondel CAMJJ (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**:1-11.
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M and Conradt HS (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal* **16**:81-97.

Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, Dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, I.A. W, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büsow K and Gunsalus KC (2008) Protein production and purification. *Nature Methods* **5**:135-146.

Graumann K and Premstaller A (2006) Manufacturing of Recombinant Therapeutic Proteins in Microbial Systems. *Biotechnology Journal* **1**:164-186.

Gressel J (1979) Blue light photoreception. *Photochemistry and Photobiology* **30**:749-754.

Griesbeck C, Kobl I and Heitzer M (2006) *Chlamydomonas reinhardtii* : a Protein Expression System for Pharmaceutical and Biotechnological Proteins. *Molecular Biotechnology* **34**:213-223.

Grillberger L, Kreil T, R., Nasr S and Reiter M (2009) Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal* **4**:186-201.

Group NP (2003) Barnyard Biotech - Lame Duck or Golden Goose. *Nature Biotechnology* **21**:965-967.

- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Kumar Pati P, Rideau M and Gantet P (2006) Hairy Root Research: Recent Scenario and Exciting Prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:341-346.
- Gustafsson C, Govindarajan S and Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**:346-353.
- Haas JH, Moore LW, Ream W and Manulis S (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* **61**:2879-2884.
- Hamada A, Yamaguchi K-I, Ohnishi N, Harada M, Nikumaru S and Honda H (2005) High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene. *Plant Biotechnology Journal* **3**:43-55.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* **22**:1415-1422.
- Hisiger S and Jolicoeur M (2005) Plant cell culture monitoring using an in situ multiwavelength fluorescence probe. *Biotechnology Progress* **21**:580-589.
- Hisiger S and Jolicoeur M (2007) Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochemistry Reviews* **6**:207-234.
- Hjortso M (1997) Mathematical modelling of hairy root cultures, in *Hairy roots culture and applications* (Doran PM ed) pp 169-178, Amsterdam: Harwood Academic Publisher.
- Horsch RB, J.E. F, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT (1985) A simple and general-method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231.
- Houdebine L-M (2002) Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:625-629.

- Houdebine L-M (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases* **32**:107-121.
- Hsiao TY, Bacani FT, Carvalho EB and Curtis WR (1999) Development of a low capital investment reactor system: application for plant cell suspension culture. *Biotechnology Progress* **15**:114-122.
- Huang SY, Shen YW and Chan HW (2002) Development of a bioreactor operation strategy for L-DOPA production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:779-791.
- Huang T-K and McDonald KA (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal* **45**:168-184.
- Huang T-K, Plesha MA, Falk BW, Dandekar AM and McDonald KA (2009) Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **102**:508-520.
- Huynh CQ and Zieler H (1999) Construction of molecular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *Journal of Molecular Biology* **288**:13-20.
- Ikonomou L, Schneider YJ and Agathos SN (2003) Insect culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**:1-20.
- Jacquemart R, Chavane N, Durocher Y, Hoemann C, de Crescenzo G and Jolicoeur M (2007) At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnology and Bioengineering* **100**:184-188.

- James E, Mills DR and Lee JM (2002) Increased production and recovery of secreted foreign proteins from plant cell cultures using an affinity chromatography. *Biochemical Engineering Journal* **12**:205-213.
- Jana S and Deb JK (2005) Strategies for Efficient Production of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**:289-298.
- Jarvis DL (2003) Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production *Virology* **310**:1-7.
- Jenkins N, Meleady P, Tyther R and Murphy L (2009) Strategies for analysing and improving the expression and quality of recombinant proteins made in mammalian cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **53**:73-83.
- Joh LD and VanderGheynst JS (2006) Agroinfiltration of plant tissues for production of high-value recombinant proteins: an alternative to production in transgenic crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**:2002-2006.
- Jolicoeur M (2006) Thoughts and tools for reducing variability of *in vitro* tissue and bioreactor cultures, in *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II* (Teixeira da Silva JA ed) p 571: Global Science Books.
- Jolicoeur M, Bouchard-Marchand É, Bécard G and Perrier M (2003) Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Ecological Model* **163**:247-267.
- Jolicoeur M, Chavarie C, Carreau P and Archambault J (1992) Development of a Helical-Ribon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture. *Biotechnology and Bioengineering* **39**:511-521.
- Jordan M and Wurm F (2004) Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* **33**:136-143.

- Joshi L, Shuler ML and Wood HA (2001) Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells. *Biotechnology Progress* **17**:822-827.
- Jungbauer A (2007) Editorial: Biopharmaceutical technologies. *Biotechnology Journal* **2**:647.
- Kamarck ME (2006) Building Biomanufacturing Capacity - the Chapter and Verse. *Nature Biotechnology* **24**:503-505.
- Kapila J, De Rycke R, van Montagu M and Angenon G (1996) Agrobacterium mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**:101-108.
- Karhunen T, Mäntylä A, Navalainen KMH and Suominen PL (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics* **241**:515-522.
- Kaulen H, Schell J and Kreuzaler F (1986) Light-induced expression of the chimeric chalcone synthase-NPTII gene in tobacco cells. *The EMBO Journal* **5**:1-8.
- Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J, Wu H and Li Y (2006) Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta* **223**:1090-1100.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R and Vézina L-P (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* **64**:135-143.
- Kilani J and Lebeault J-M (2007) Study of the Oxygen Transfer in a Disposable Flexible Bioreactor with Surface Aeration in Vibrated Medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**:324-330.
- Kim KI, Sunter G, Bisaro DM and Chung IS (2007) Improved expression of recombinant GFP using a replicating vector based on *Beet curly top virus* in leaf-disks and infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Molecular Biology* **64**:103-112.

- Kim MO, Kim SH, Lee SR, Kim KS, Min KS, Lee HT, Kim SJ and Ryoo ZY (2006) Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-GSF) into mouse urine. *Life Sciences* **78**:1003-1009.
- Kim T-G, Lee H-J, Jang Y-S, Shin T-H and Yang M-S (2008) Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture. *Protein Expr Purif* **61**:117-121.
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME and Maliga P (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particule bombardment process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**:8502-8505.
- Ko K, Steplewski Z, Glogowska M and Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**:7026-7030.
- Koebnik R, Locher KP and Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* **37**:239-253.
- Komarnytsky S, Borisjuk N, Yakoby N, Garvey A and Raskin I (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiology* **141**:1185-1193.
- Kost TA, Condreay PJ and Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* **23**:567-575.
- Kulakosky PC, Hughes PR and Wood HA (1998) N-linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* **8**:741-745.
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ and Bapat VA (2005) Secretion of hepatitis B surface antigen in transformed tobacco cell suspension cultures. *Biotechnology Letters* **27**:927-932.

- Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ and Bapat VA (2006) Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science* **170**:918-925.
- Kusnadi AR, Nikolov Z and Howard JA (1997) Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56**:473-484.
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D and Burgyan J (2004) Molecular Mechanism of RNA Silencing Suppression Mediated by p19 Protein of Tombusviruses. *EMBO Journal* **23**:876-884.
- Lamboursain L, St-Onge F and Jolicoeur M (2002) A Lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology Progress* **18**:1377-1386.
- Larrick JW and Thomas DW (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:411-418.
- Le ATT and Schumann W (2007) A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification* **53**:264-269.
- Ledford H (2006) The Farmyard Drug Store. *Nature* **443**:16-17.
- Lee J-H, Kim N-S, Kwon T-H and Yang M-S (2002) Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:768-773.
- Lee K-T, Chen S-C, Chiang B-L and Yamakawa T (2007) Heat-inducible production of  $\beta$ -glucuronidase in tobacco hairy root cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**:1047-1053.
- Lee S-Y, Kim Y-H, Roh Y-S, Myoung H-J, Lee K-Y and Kim D-I (2004) Bioreactor operation for transgenic *Nicotiana tabacum* cell cultures and continuous production of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by perfusion culture. *Enzyme and Microbial Technology* **35**:663-671.



- Lee SY (1996) High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **14**:98-105.
- Lee SY and Kim DI (2002) Stimulation of murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by Pluronic F-68 and polyethylene glycol in transgenic *Nicotiana tabacum* cell culture *Biotechnology Letters* **24**:1779-1783.
- Li G-Q, Shin JH and Lee JM (1995) Mineral oil addition as a means of foam control for plant cell cultures in stirred tank fermenters. *Biotechnology Techniques* **9**:713-718.
- Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J and Chiang VL (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4939-4944.
- Liénard D, Sourrouille C, Gomord V and Faye L (2007) Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review* **13**:115-147.
- Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Ilgen C and Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:329-332.
- Liu C, Dalby B, Chen W, Kilzer JM and Chiou HC (2008) Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular Biotechnology* **39**:141-153.
- Liu C, Towler MJ, Medrano G, Cramer CL and Weathers PJ (2009) Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in a airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **102**:1074-1086.
- Ma J, Drake P and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* **4**:794-805.
- Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in Applied Microbiology* **51**:81-106.

- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, Hayglass K and Lee JM (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr Purif* **13**:45-52.
- Maras M, van Die I, Contreras R and van den Hondel CAMJJ (1999) Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glucconjugate Journal* **16**:9-107.
- Massoud M, Attal J, Thépot D, Pointu H, Stinnakre MG, Théron MC, Lopez C and Houdebine L-M (1996) The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction, Nutrition, Development* **36**:555-563.
- Mayfield SP and Franklin SE (2005) Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae. *Vaccine* **23**:1828-1832.
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M and Marin-Navaroo J (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories *Current Opinion in Biotechnology* **18**:126-133.
- McCarroll L and King LA (1997) Stable insect cultures for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* **8**:590-594.
- Mergulhao FJM, Monteiro GA, Cabral JMS and Taipa MA (2004) Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**:1-14.
- Mergulhao FJM, Summers DK and Monteiro GA (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* **23**:177-202.
- Mett V, Farrance CE, Green BJ and Yusibov V (2008) Plants as biofactories. *Biologicals* **36**:354-358.

- Metz B and Kossen NWF (1997) Biotechnology review: the growth of molds in the form of pellets - a literature review. *Biotechnology and Bioengineering* **19**:781-799.
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *TRENDS in Biotechnology* **15**:45-50.
- Mirksch G, Betteworth F, Friehs K, Flashel E, Axel S, Twellmann T and Nattkemper TW (2005) Libraries of synthetic stationary-phase and stress promoter as a tool for fine-tuning of expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **120**:25-37.
- Mistry PK, Wraight EP and Cox TM (1996) Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. *The Lancet* **348**:1555-1559.
- Mochizuki S, Hamato N, Masaaki H, Miyano K, Ohtani W, Kameyama S, Kuwae S, Tokuyama T and Ohi H (2001) Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **23**:55-65.
- Mujacic M, Cooper KW and Baneyx F (1999) Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene*:325-332.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473-497.
- Murashima K, Chen CL, Kosugi A, Tamaru Y, Doi RH and S.-L. W (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of Bacteriology* **184**:76-81.
- Nagata T, Nemoto Y and Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**:1-30.

- Narasimhulu SB, Deng X-B, Sarria R, Gelvin SB. 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA Genes in Tobacco and Maize. *The Plant Cell* **8**:873-886.
- Nevalainen HKM, Te'o VSJ and Bergquist P (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology* **23**:468-474.
- Nikolo ZL and Woodard SL (2004) Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:479-486.
- Odell JT, Nagy F and chua NH (1985) Identification of DNA sequences for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**:810-812.
- Okita B, Arcuri E, Turner K, Sharr D, Del Tito B, Swanson J, Shatzman A and Zabriskie D (1989) Effect of induction temperature on the production of malaria antigens in recombinant *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **34**:854-862.
- Okonkowski J, Balasubramanian U, Seamans C, Fries S, Zhang J, Salmon P, Robinson D and Chartrain M (2007) Cholesterol Delivery to NSO Cells: challenges and Solutions in Disposable Linear Low-Density Polyethylene-Based Bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**:50-59.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW and Rothstein RJ (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:6354-6358.
- Padidam M (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:169-177.
- Parekh R (1989) Polypeptide glycosylation and biotechnology. *Biotech Eur* **6**:18-21.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL and Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**:3324-3328.

- Pham PL, Kamen A and Durocher Y (2006) Large-Scale transfection of mammalian cells for fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology* **34**:225-237.
- Plesha MA, Huang T-K, Dandekar AM, Falk BW, McDonald KA. 2007. High-Level transient production of a heterologous protein in plants by optimizing induction of a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnology Progress* **23**:1277-1285.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology* **31**:245-259.
- Prins A and van't Riet K (1987) Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *TRENDS in Biotechnology* **5**:296-301.
- Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodriguez M, Gonzalez EM and Perez L (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology* **25**:455-459.
- Qiu W, Park J-W, Scholthof HB. 2002. Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage feature that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**(3):269-280.
- Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T and Riazuddin S (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* **27**:753-763.
- Ratcliff F, MacFarlane S and Baulcombe DC (1999) Gene Silencing Without DNA:RNA-Mediated Cross Protection Between Viruses. *Plant Cell* **14**:689-702.
- Redwan E-RM (2009) Animal-derived pharmaceuticals proteins. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **30**:262-290.
- Reed JC, Kasschau KD, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Pogue GP, Carrington JC and Dolja VV (2003) Suppressor of RNA Silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* **306**:203-209.

- Rijhwani SK and Shanks JV (1998) Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:606-611.
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**:571-573.
- Ritterhauss E, Ulrich J and Westphal K (1990) Large-scale production of plant cell cultures. *IAPTC News* **61**:2-10.
- Ritz D and Beckwith J (2001) Roles of thio-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**:21-48.
- Roth BM, Pruss GJ and Vance VB (2004) Plant Viral Suppressors of RNA Silencing. *Virus Research* **102**:97-108.
- Ruiz-Diez B (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* **92**:189-195.
- Sahara T, Goda T and Ohgiya S (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic response in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry* **277**:50015-50021.
- Saidi Y, Finka A, Chakhporanian M, Zrýd J-P, Schaefer DG and Goloubinoff P (2005) Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella* patents by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Molecular Biology* **59**:697-711.
- Sainsbury F and Lomonosoff GP (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiology* **148**:1212-1218.

- Sainsbury F, Thuenemann EC and Lomonosoff GP (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**:682-693.
- Salovouri I, Makarow M, Rauvala H, Knowles J and Kääriäinen L (1987) Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **5**:152-156.
- Sandhu KS, Pandey S, Maiti S and Pillai B (2008) GASCO: genetic algorithm simulation for codon optimization. *In Silico Biology* **8**:187-192.
- Sandkvist M and Bagdasarian M (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **7**:505-511.
- Sardana R, Dudani AK, Tackaberry E, Alli Z, Porter S, Rowlandson K, Ganz P and Altosaar I (2007) Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants. *Transgenic Res* **16**:713-721.
- Schatz SM, Kerschbaumer RJ, Gerstenbauer G, Kral M, Dorner F and Scheiflinger F (2003) Higher expression of fab antibody fragment in CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnology and Bioengineering* **84**:433-438.
- Schiermeyer A, Schinkel H, Apel S, Fischer R and Schillberg S (2005) Production of Desmodus rotundus salivary plasminogen activator  $\alpha 1$  (DSPA $\alpha 1$ ) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **89**:848-858.
- Schillberg S, Twyman RM and Fischer R (2005) Opportunities for recombinants antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine* **23**:1764-1769.
- Schlaeger E-J (1996) Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* **20**:57-70.

- Schmale K, Rademacher T, Fischer R and Hellwig S (2006a) Towards industrial usefulness - cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *Journal of Biotechnology* **124**:302-311.
- Schmale K, Rademacher T, Fischer R and Hellwig S (2006b) Towards industrial usefulness - cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *J Biotechnol* **124**:302-311.
- Schmidt FR (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**:363-372.
- Serrato JA, Hernandez V, Estrada-Mondaca S, Palomares LA and Ramirez OT (2007) Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **47**:113-124.
- Sharma A, K. and Sharma M, K. (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27**:811-832.
- Sharp PM and Li WH (1987) The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research* **15**:1281-1295.
- Shekhawat UKS, Ganapathi TR, Srinivas L, Bapat VA and Rathore TS (2008) Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Santalum album* L. *Plant Cell Tissus and Organs Culture* **92**:261-271.
- Shih S, M.-H. and Doran PM (2009) Foreign protein production using plant cell and organ cultures: Advantages and limitations. *Biotechnology Advances* **27**:1036-1042.
- Shokri A, Sanden AM and Larsson G (2003) Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**:654-664.



- Siegelman HW, Turner BC and Hendricks SB (1966) The chromophore of phytochrome. *Plant Physiology* **41**:1289-1292.
- Simmons CW, VanderGheynst JS and Upadhyaya S (2009) A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent *in planta* transgene transient expression. *Biotechnol Bioeng* **102**:965-970.
- Sinclair AM and Elliott S (2005) Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**:1626-1635.
- Singh V (1999) Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* **30**:149-158.
- Smith GE, Summers DK and Fraser MJ (1983) Production of human b-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* **3**:2156-2165.
- Soderquist RG and Lee JM (2005) Enhanced production of recombinant proteins from plant cells by the application of osmotic stress and protein stabilization. *Plant Cell Reports* **24**:127-132.
- Soler E, Thépot D, Rival-Gervier S, Jolivet G and Houdebine L-M (2006) Preparation of recombinant proteins in silk to improve human and animal health. *Reproduction, Nutrition, Development* **46**:579-588.
- Spena A, Hain R, Ziervogel U, Saedler H and Schell J (1985) Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila hsp70* promoter in plants. *The EMBO Journal* **4**:2739-2743.
- Srivastava S and Srivastava AK (2007) Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* **27**:29-43.
- Stacey G and Possee R (1996) Safety aspects of insect cell culture. *Cytotechnology* **20**:299-304.

- Su WW and Arias R (2003) Continuous plant cell perfusion culture: bioreactor characterization and secreted enzyme production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**:13-20.
- Su WW, He BJ, Liang H and Sun S (1996) A perfusion air-lift bioreactor for high density plant cell cultivation and secreted protein production. *J Biotechnol* **50**:225-233.
- Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell KJ, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S and Logan JS (1992) Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology* **10**:557-559.
- Tanaka H (1982) Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. *Biotechnology and Bioengineering* **24**:425-442.
- Taticek RA, Moo-Young M and Legge RL (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **24**:139-159.
- Taura T, Kusukawa N, Yura T and Ito K (1989) Transient shut off of Escherichia coli heat shock protein synthesis upon temperature shift down. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **163**:438-443.
- Teoh KH, Weathers PJ, Cheetham RD and Walcerz DB (1996) Cryopreservation of transformed (hairy) roots of *Artemisia annua*. *Cryobiology* **33**:106-107.
- Terashima M, Ejiri Y, Hashikawa N and Yoshida H (1999) Effect of osmotic pressure on human  $\alpha_1$ -antitrypsin production by plant cell culture. *Biochemical Engineering Journal* **4**:31-36.
- Tiwari S, Verma P, C., Singh PK and tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccines antigens. *Biotechnology Advances* **27**:449-467.
- Tomiya N, Betenbaugh MJ and lee Y, C. (2003) Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins. *Accounts of Chemical Research* **36**:613-620.

- Trexler MM, McDonald KA and Jackman AP (2002) Bioreactor production of human  $\alpha$ 1-Antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnology Progress* **18**:501-508.
- Tsao EI, Bohn MA, Numsuwan V, Omstead DR and Munster MJ (1992) Effects of heat shock on the production of human erythropoietin from recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* **40**:1190-1196.
- Twyman RM (2004) Host plants, systems and expression strategies for molecular farming, in *Molecular Farming* (Fischer R and Schillberg S eds) pp 191-216: Wiley-VCH.
- Twyman RM, Stroger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* **21**:570-578.
- Valax P and Georgiou G (1993) Molecular characterization of  $\beta$ -lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **9**:539-547.
- Vance V and Vaucheret H (2001) RNA Silencing in Plants - Defense and Counterdefense. *Science* **292**:2277-2280.
- Vaucheret H, Beclin C and Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**:3083-3091.
- Vézina L-P, Faye L, Lerouge P, D'Aoust M-A, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie P-O, Bardor M and Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like *N-glycans* in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**:442-455.
- Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E and Donini M (2008) Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal* **7**:59-72.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**:669-687.

- Voinnet O, Lederer C and Baulcombe DC (2000) A Viral Movement protein Prevents Systemic Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**:157-167.
- Voinnet O, Pinto YM and Baulcombe D (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**:14147-14152.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D (2003) An Enhanced Transient Expression System in Plants Based on Suppression of Gene Silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**:949-956.
- Wahl MF, An G and Lee JM (1995) Effects of dimethyl sulfoxide on heavy chain monoclonal antibody production from plant cell culture. *Biotechnology Letters* **17**:463-468.
- Walmsley AM and Arntzen CJ (2000) plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* **14**:145-150.
- Walsh G (2003) Biopharmaceutical benchmarks - 2003. *Nature Biotechnology* **21**:865-870.
- Walsh G (2005) Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol* **23**:553-558.
- Walsh G (2006) Biopharmaceutcial Benchmarks 2006. *Nature Biotechnology* **24**:769-776.
- Wang L, Ridgway D, Gu T and Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* **23**:115-129.
- Westers L, Westers H and Quax WJ (2004) *Bacillus subtilis* as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**:299-310.
- Wongsamuth R and Doran PM (1994) Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams. *Biotechnology and Bioengineering* **44**:481-488.

- Wongsamuth R and Doran PM (1997) Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering* **54**:401-415.
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* **22**:1393-1398.
- Wydro M, Kozubek E and Lehmann P (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* **53**:289-298.
- Yatsushashi H, Hashimoto T and Shimizu S (1982) Ultraviolet action spectrum for anthocyanin formation in broom sorghum first internodes. *Plant Physiology* **70**:735-741.
- Yoon SK, Song JY and Lee GM (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in chinese hamster ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **82**:289-298.
- Yoshida K, Kasai T, Garcia MRC, Sawada S, Shoji T, Shimizu S, Yamazaki K, Komeda Y and Shinmyo A (1995) Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the *HSP18.2* promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**:466-472.
- Yoshida N and Sato M (2009) Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**:791-798.
- Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson S, Denq DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, R.M. K, Kerchner A, Leighton PA, Mather CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiaccinto P, Wong S, Zhou W and Etches RJ (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology* **23**:1159-1169.

**ANNEXE 1 – Detailed list of recombinant protein drugs on the market  
and discontinued per production platform**

**Table S1-A. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *E. coli* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Accretropin</b> Somatotropin recomb.	Cangene	2008	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Cimzia</b> Certolizumab pegol	UCB Inc.	2008	NA	Indicated for reducing signs and symptoms of Crohn's disease
<b>Extavia</b> Interferon beta-1b	Novartis	NA	2008	Treatment of relapsing forms of multiple sclerosis
<b>Nplate</b> Romiplostim	Amgen	2008	NA	Indicated for the treatment of thrombocytopenia in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura
<b>Exubera</b> Human Insulin recomb.	Pfizer	2006	2006	Long-lasting insulin for the control of diabetes
<b>Lucentis</b> Ranibizumab	Genentech	2006	2007	Treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration
<b>Omnitrope</b> Somatotropin recomb.	Sandoz	2006	2006	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Preotact</b> Parathyroid hormone recomb.	Nycomed	NA	2006	Treatment of postmenopausal osteoporosis
<b>Fortical</b> Calcitonin salmon recomb.	Upsher Smith	2005	2003	Treatment of postmenopausal osteoporosis
<b>Increlex</b> Mecasermin recomb.	Tercica	2005	2007	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>IPLX</b> Mecasermin Rinfabate recomb.	Insmed	2005	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Tev-Tropin<sup>1</sup></b> Somatotropin recomb.	Ferring	2005	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)

**Table S1-A. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *E. coli* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009 (continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Apidra</b> Insulin glulisine recomb.	Sanofi Aventis US	2004	2004	Rapid-acting insulin for the control of diabetes
<b>Dukoral</b> <sup>2</sup> Cholera Toxin B subunit recomb.	SBL Vaccin AB	2004	2004	Oral cholera vaccine
<b>Keprance</b> Palifermin	Amgen	2004	2005	Indicated to decrease the incidence of severe oral mucositis in patients with blood disorders
<b>Somavert</b> Pegvisomant	Pharmacia and Upjohn	2003	2002	Treatment of acromegaly in patients who have had an inadequate response to surgery and/or radiation therapy
<b>Forteo (US) / Forsteo (EU)</b> Teriparatide human recomb.	Eli Lilly	2002	2003	Treatment of postmenopausal osteoporosis
<b>Neulasta</b> Pegfilgrastim	Amgen	2002	2002	Indicated to decrease the incidence of infection, as manifested by febrile neutropenia, in patients with non-myeloid malignancies
<b>Pegasys</b> Peginterferon alfa-2a	Hoffman-La Roche	2002	2002	Treatment of chronic Hepatitis C
<b>Kineret</b> Anakinra	Amgen	2001	2002	Indicated to reduce symptoms and slowing the progression of structural damage in mod.to severely active rheumatoid arthritis
<b>Liprolog</b> Insulin Lispro	Eli Lilly	NA	2001	Control of diabetes
<b>Natrecor</b> Nesiritide recomb.	Scios	2001	NA	Treatment of patients with acutely decompensated congestive heart failure
<b>PegIntron</b> Peginterferon alfa-2b	Schering-Plough	2001	2000	Treatment of chronic Hepatitis C
<b>Lantus</b> Insulin Glargine recomb.	Sanofi Aventis US	2000	2000	Long-lasting insulin for the control of diabetes

**Table S1-A. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *E. coli* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009 (continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Optisulin</b> Insulin glargine recomb.	Aventis	NA	2000	Long-lasting insulin for the control of diabetes
<b>ViraferonPeg</b> Peginterferon alfa-2b	Schering-Plough	NA	2000	Treatment of chronic Hepatitis C
<b>Beromun</b> Tasonermin	Boehringer Ingelheim	NA	1999	As an adjunct to surgery for subsequent removal of the tumour so as to prevent or delay amputation
<b>Forcaltonin</b> Salmon calcitonin recomb.	Unigene	NA	1999	Treatment of Paget disease and prevention of osteoporosis
<b>Ontak</b> Denileukin difitox	Seragen	1999	NA	Treatment of patients with persistent or recurrent cutaneous T-Cell lymphoma
<b>Glucagon</b> Glucagon recomb.	Eli Lilly	1998	NA	Treatment of hypoglycemia
<b>Infergen</b> Interferon alfacon-1	Intermune Pharms	1997	1999	Treatment of chronic Hepatitis C
<b>Insuman</b> Human insulin recomb.	Hoechst AG	NA	1997	Control of Diabetes
<b>Neumega</b> Oprelvekin	Wyeth Pharms Inc.	1997	NA	Stimulates megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis and reduces the need for platelet transfusions
<b>Humalog</b> Insulin lispro recomb	Eli Lilly	1996	1996	Control of Diabetes
<b>Retavase(US) / Rapilysin(EU)</b> Retepase	Centocor Inc. / Roche	1996	1996	Indicated to reduce the incidence of congestive heart failure
<b>Genotropin</b> Somatropin recomb.	Pharmacia and Upjohn	1995	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)



Table S1-A. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *E. coli* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009 (continued)

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Norditropin</b> Somatropin recomb.	Novo Nordisk Inc.	1995	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Nutropin</b> <sup>3</sup> Somatropin recomb.	Genentech	1994	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Betaseron(US)/Betaferon(EU)</b> Interferon beta-1b	Chiron / Schering	1993	1995	Treatment of relapsing forms of multiple sclerosis
<b>Proleukin</b> Aldesleukin	Chiron	1992	NA	Indicated for the treatment of adults with metastatic melanoma
<b>Neupogen</b> Filgrastim	Amgen	1991	NA	Indicated to decrease the incidence of infection in patients with non-myeloid malignancies by febrile neutropenia
<b>Actimmune</b> Interferon gamma-1b	Genentech	1990	NA	Treatment of chronic Granulomatous Disease and severe malignant osteopetrosis
<b>Humatrope</b> Somatropin recomb.	Eli Lilly	1987	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Intron A</b> Interferon alfa-2b	Schering-Plough	1986	2000	Treatment of chronic hepatitis B and C, hairy cell leukemia, malignant melanoma, follicular lymphoma and AIDS-related Kaposi's sarcoma
<b>Roferon A</b> Interferon alfa-2A	Hoffman-La Roche	1986	NA	Treatment of chronic Hepatitis C
<b>Humulin</b> <sup>4</sup> Human Insulin Recomb.	Eli Lilly	1982	NA	Control of Diabetes

<sup>1</sup>: It was first commercialized in the US (1995) under the name Bio-tropin

<sup>2</sup>:The recombinant cholera toxin subunit B of Dukoral is produced in a recombinant strain of the bacteria *Vibrio cholera*, not *E. coli*

<sup>3</sup>: Different formulations exist on the market (Nutropin (powder) and Nutropin AQ (solution) is the first ready-to-use growth hormone (US 1995; EU 2001)

<sup>4</sup>: Different formulations exist on the market (70/30, N and R) but some have been discontinued (50/50, BR, L and U)

**Table S1-B. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *E. coli* discontinued by July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Viraferon</b> Interferon alfa-2b	Schering-Plough	NA	2000	Treatment of Hepatitis B and C Discontinued in November 2008
<b>Forcaltonin</b> Salmon calcitonin recomb.	Unigene	NA	1999	Indicated to prevent bone loss by osteoporosis and Paget disease Discontinued in November 2008
<b>Rebetron</b> Interferon alfa-2b + ribavirin	Schering-Plough	1999	NA	Treatment of hepatitis B and C, hairy cell leukemia, AIDS-related Kaposi's sarcoma and malignant melanoma. Discontinued in 2004
<b>Triacelluvax</b> Trivalent vaccine with pertussis toxin recomb.	Chiron	NA	1999	Indicated for the vaccination against Diphtheria, Tetanus and Pertussis Discontinued in 2002
<b>LYMERix</b> OspA recomb. <sup>1</sup>	GlaxoSmithKline	1998	NA	Vaccine against Lyme disease Discontinued in February 2002
<b>Ecokinase</b> Retepase	Galenus Mannheim	NA	1996	Indicated to reduce the incidence of congestive heart failure Discontinued in 1999
<b>Protropin</b> Somatrem recomb.	Genentech	1985	NA	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature) Discontinued in 2002

<sup>1</sup>:Osp = Outer Surface protein

**Table S1-C. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *S. cerevisiae* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Valtropin</b> Somatropin recomb.	LG Life	2007	2006	Treatment of a growth disorders (growth failure or short stature)
<b>Gardasil/Silgard (Eastern EU)</b> Human Papillomavirus type 6, 11, 16 and 18 recomb.	Merck	2006	2006	Indicated for women 9 through 26 years old age to prevent diseases caused by Human Papillomavirus (HPV)
<b>M-M-RVAXPRO<sup>1</sup></b> Trivalent vaccine with albumin rec.	Sanofi Pasteur	NA	2006	Indicated for vaccination against measles, mumps, and rubella.
<b>Fendrix</b> Hepatitis B surface antigen rec.	GSK Biologicals	NA	2005	Indicated for vaccination against Hepatitis B
<b>GEM 21S</b> Becaplermin	BioMimetics Therapeutics	2005	NA	Grafting system for bone and periodontal regeneration (it combines a matrix with Regranex)
<b>Levemir</b> Insulin detemir recomb.	Novo Nordisk Inc.	2005	2004	Long-lasting insulin for the control of diabetes
<b>Iprivask (US) /Revasc (EU)</b> Desirudin recomb.	Canyon Pharmaceuticals	2003	1997	Indicated for the prevention of deep venous thrombosis
<b>Actrapid / Actraphane / Insulatard / Mixtard</b> Human Insulin recomb.	Novo Nordisk Inc.	NA	2002	Control of Diabetes (They are all different formulations (short-, medium or long-lasting) of the same insulin)
<b>Ambirix</b> Hepatitis B surface antigen rec.	GSK Biologicals	NA	2002	Indicated for vaccination against Hepatitis A and B
<b>Elitek (EU) / Fasturtec (EU)</b> Rasburicase	Sanofi SyntheLabo	2002	2001	Indicated for the initial management of plasma uric acid levels in pediatric patients with leukemia, lymphoma, and tumor malignancies

Table S1-C. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *S. cerevisiae* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009 (continued)

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Pediarix(US)/InfanrixPenta(EU)</b> Pentavalent vaccine with Hepatitis B surface antigen rec.	GSK Biologicals	2002	2000	Indicated for vaccination of children against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis), hepatitis B virus and polio virus.
<b>HbVaxpro</b> Hepatitis B surface antigen rec.	Sanofi Pasteur	NA	2001	Indicated for vaccination against Hepatitis B
<b>Twinrix Adul or Paediatric</b> <sup>2</sup> Hepatitis B surface antigen rec.	GSK Biologicals	2001	1996	Indicated for vaccination against Hepatitis A and B
<b>Infanrix HEXA</b> Hexavalent vaccine with Hepatitis B surface antigen rec.	GSK Biologicals	NA	2000	Indicated for vaccination of children against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis), hepatitis B virus, polio virus and <i>Hemophilus influenzae</i> type b.
<b>Novolog (US)/NovoRapid(EU)</b> Insulin aspart recomb.	Novo Nordisk Inc.	2000	2000	Control of Diabetes (rapid-acting insulin)
<b>Engerix-B</b> Hepatitis B surface antigen	GSK Biologicals	1998	NA	Indicated for vaccination against Hepatitis B
<b>Glucagen</b> Glucagon Hydrochloride recomb.	Novo Nordisk Inc.	1998	NA	Treatment of hypoglycemia
<b>Refludan</b> Lepidurin recomb.	Bayer HealthCare	1998	1997	Indicated for anticoagulation in patients with heparin-associated thrombocytopenia and associated thromboembolic disease
<b>Regranex</b> Becaplermin	OMJ Pharmaceuticals	1997	1999	Treatment of lower extremity diabetic neuropathic ulcers that extend into the subcutaneous tissue
<b>Comvax (US)/Procomvax(EU)</b> Hepatitis B recomb vaccine	Merck (US) / Sanofi (EU)	1996	1999	Indicated for vaccination of infants 6 weeks to 15 months of age against <i>H. influenzae</i> type B and Hepatitis B

**Table S1-C. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *S. cerevisiae* on the market on July 1<sup>st</sup> 2009 (continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Description
		US	EU	
<b>Tritanrix HepB</b> Tetravalent vaccine with Hepatitis B surface antigen recomb.	GSK Biologicals	NA	1996	Indicated for vaccination of children against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis) and hepatitis B
<b>Leukine</b> Sargramostim	Berlex Labs	1991	NA	Treatment of patients following chemotherapy in patients 55 years and older with acute myelogenous leukemia
<b>Novolin</b> Human Insulin recomb.	Novo Nordisk Inc.	1991	NA	Control of Diabetes
<b>Recombivax HB</b> Hepatitis B surface antigen recomb.	Merck	1986	NA	Indicated for vaccination against Hepatitis B

<sup>1</sup>: *S. cerevisiae* is used to produce the excipient (Recombumin)

<sup>2</sup>: The vaccine is identical in both formulations, only the volume injected differs. Twinrix Paediatric was approved in 1997 (EU).

**Table S1-D. Detailed list of recombinant protein drugs produced in *S. cerevisiae* discontinued by July 1<sup>st</sup> 2009**

<b>Drug commercial name &amp; molecule name</b>	<b>Company</b>	<b>Approval Date</b>		<b>Description</b>
		<b>US</b>	<b>EU</b>	
<b>Quintarix</b> Pentavalent vaccine with Hepatitis B surface antigen recomb.	GSK Biologicals	NA	2005	Indicated for vaccination of children against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis), hepatitis B virus and <i>Hemophilus influenzae</i> type b. Discontinued in August 2008
<b>Hexavac</b> Hexavalent vaccine with Hepatitis B surface antigen recomb.	Aventis Pasteur	NA	2000	Indicated for vaccination of infants and children against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis), hepatitis B virus, polio virus and Hemophilus influenzae type b. Discontinued in September 2005
<b>Primavax</b> Trivalent vaccine with Hepatitis B surface antigen recomb.	Aventis Pasteur	NA	1998	Indicated for vaccination of children against diphtheria, tetanus and hepatitis B Discontinued on July 2000
<b>Infanrix HepB</b> Tetravalent vaccine with Hepatitis B surface antigen recomb.	GSK Biologicals	NA	1997	Indicated for vaccination of children over the age of 2 against diphtheria, tetanus, whooping cough (pertussis) and hepatitis B virus. Discontinued in August 2005
<b>Velosulin / Monotard / Ultratard</b> Human Insulin recomb.	Novo Nordisk Inc.	NA	1992	They are all different formulations (short-, medium or long-lasting) of the same insulin (See Actrapid). Monotard and Ultratard were discontinued in August 2007 while Velosulin was April 2009

Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>RoActemra</b> <sup>1</sup> Tocilizumab	Roche	NA	2009	CHO cells	Indicated for the treatment of moderate to severe active rheumatoid arthritis
<b>Simponi</b> Golimumab	Centocor ortho Biotech Inc.	2009	NA	Murine cells	Indicated for the treatment of moderately to severely active Rheumatoid arthritis
<b>Stelara</b> Ustekinumab	Janssen-Cilag	NA	2009	Murine Myeloma	Indicated for patients with moderate to severe plaque psoriasis
<b>Arcalyst</b> Rilonacept	Regeneron Pharmaceuticals	2008	NA	CHO cells	Indicated for the treatment of Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS)
<b>Recothrom</b> Human thrombin recomb.	ZymoGenetics	2008	NA	CHO cells	Indicated as an aid to hemostasis whenever oozing blood and minor bleeding from capillaries is accessible
<b>Xyntha(US)/ReFactoAF(EU)</b> <sup>2</sup> Antihemophilic Factor VII recomb.	Wyeth Pharms Inc.	2008	2008	CHO cells	Indicated to control and prevent bleeding episodes in patients with hemophilia A
<b>Abseamed</b> Erythropoietin alfa recomb.	Medice Arzneimittel Pütter	NA	2007	CHO cells	Indicated for treatment of anemia, and to reduce the need for blood transfusions in patients with mild anemia
<b>Binocrit</b> Erythropoietin alfa recomb.	Sandoz	NA	2007	CHO cells	Indicated for treatment of anemia, and to reduce the need for blood transfusions in patients with mild anemia
<b>Epoetin alfa Hexal</b> Erythropoietin alfa recomb.	Hexal AG	NA	2007	CHO cells	Indicated for treatment of anemia, and to reduce the need for blood transfusions in patients with mild anemia
<b>Mircera</b> Methoxy Polyethylene glycol-epoetin beta	Hoffman – La Roche	2007	2007	CHO Cells	Indicated for the treatment of anemia associated with Chronic Renal Failure
<b>Pergoveris</b> <sup>3</sup> Follitropin alfa / Lutropin alfa	Serono Europe	NA	2007	CHO cells	Indicated to treat women with severe deficiency in luteinising hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)

**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Retacrit</b> Epoetin alfa	Hospira Enterprises	NA	2007	CHO cells	Indicated for the treatment of anaemia associated with chronic renal failure (CRF)
<b>Silapo</b> Epoetin alfa	Stada Arzneimittel	NA	2007	CHO cells	Indicated for the treatment of anaemia associated with chronic renal failure (CRF)
<b>Soliris</b> Eculizumab	Alexion Pharm	2007	2007	Murine Myeloma	indicated for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to reduce hemolysis
<b>Elaprase</b> Idursulfase	Shire	2006	2007	Human cells	Indicated for patients with Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II)
<b>Myozyme</b> Alglucosidase alfa	Genzyme	2006	2006	CHO Cells	Indicated for patients with Pompe Disease (GAA deficiency)
<b>Vectibix</b> Panitumumab	Amgen	2006	2007	CHO Cells	Indicated as a single agent for the treatment of metastatic colorectal carcinoma
<b>Hylenex recombinant</b> Hyaluronidase recomb.	Halozyme Therapeutics	2005	NA	CHO Cells	Indicated as an adjuvant to increase the absorption and dispersion of other injected drugs
<b>Naglazyme</b> Galsulfase	Biomarin Pharmaceuticals	2005	2006	CHO Cells	Indicated for patients with Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI)
<b>Orencia</b> Abatacept	Bristol Myers Squibb	2005	NA	CHO cells	Indicated for reducing signs and symptoms inhibiting the progression of structural damage in patients with moderately to severely active rheumatoid arthritis.
<b>Avastin</b> Bevacizumab	Genentech	2004	2005	CHO cells	Indicated for first- or second-line treatment of patients with metastatic carcinoma of the colon or rectum, recurrent or metastatic non-small lung cancer
<b>Erbbitux</b> Cetuximab	ImClone	2004	2004	Murine Myeloma	Used in combination with radiation therapy for the initial treatment of squamous cell carcinoma of the head/neck and EGFR-expressing colorectal cancer



**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Follistim AQ (US)</b> <sup>4</sup> <b>/Puregon(EU)</b> Follitropin beta	Organon USA Inc.	2004	1996	CHO Cells	Indicated for the development of multiple follicles in ovulatory patients
<b>Luveris</b> Lutropin alfa	EMD Serono	2004	2000	CHO Cells	Indicated for stimulation of follicular development in infertile hypogonadotropic hypogonadal women
<b>Neutrospec</b> Fanolesomab (Technetium)	Palatin Technologies	2004	NA	Hybridoma	Indicated for scintigraphic imaging of patients with equivocal signs and symptoms of appendicitis
<b>Tysabri</b> Natalizumab	Biogen Idec	2004	2006	Murine Myeloma	Indicated as monotherapy for the treatment of patients with relapsing forms of multiple sclerosis and inducing response and remission in adult patients
<b>Advate</b> <sup>5</sup> Antihemophilic Factor recomb.	Baxter Healthcare Corp.	2003	2004	CHO Cells	Indicated in Hemophilia A for the prevention and control of bleeding episodes
<b>Aldurazyme</b> Laronidase	Biomarin Pharmaceuticals	2003	2003	CHO Cells	Indicated for patients with Hurler and Hurler-Scheie forms of Mucopolysaccharidosis (MPS I)
<b>Amevive</b> Alefcept	Astellas	2003	NA	CHO cells	Indicated for adult patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis
<b>Bexxar</b> Tositumomab	SmithKline BeeCham	2003	NA	Hybridoma (murine)	Indicated for the treatment of patients with CD20 antigen-expressing relapsed or refractory follicular or transformed non-Hodgkin's lymphoma.
<b>Fabrazyme</b> Agalsidase beta	Genzyme	2003	2001	CHO Cells	Indicated for patients with Fabry disease; reduces globotriaosylceramide deposition in capillary endothelium
<b>Raptiva</b> Efalizumab	Genentech	2003	2004	CHO Cells	Indicated for the treatment of adult patients with chronic moderate to severe plaque psoriasis
<b>Xolair</b> Omalizumab	Genentech	2003	2005	CHO Cells	Indicated for adults and adolescents with moderate to severe persistent asthma.

**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Humira (US/EU)/ Trudexa(EU)</b> <sup>6</sup> Adalimumab	Abbott	2002	2003	CHO Cells	Indicated for the treatment of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, psoriasis arthritis, ankylosing spondylitis, Crohn's Disease and Plaque psoriasis.
<b>Infuse (US) / InductOs (EU)</b> <sup>7</sup> Dibotermin alfa (BMP-2)	Medtronic Sofamor (US) / Wyeth (EU)	2002	2002	CHO cells	Indicated for the treatment of acute tibia fracture in adults
<b>Rebif</b> Interferon beta-1a	Serono Inc.	2002	1998	CHO Cells	Indicated for the treatment of patients with relapsing forms of multiple sclerosis.
<b>Zevalin</b> Ibritumomab tiuxetan	IDEC Pharmaceuticals	2002	2004	CHO Cells	Indicated in the treatment of relapsed or refractory, low-grade or follicular B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma
<b>Aranesp (US) / Nespo (EU)</b> <sup>8</sup> Darbepoetin alfa	Amgen	2001	2001	CHO Cells	Indicated for the treatment of anemia associated with Chronic Renal Failure
<b>Campath(US) /Mabcampath(EU)</b> Alemtuzumab	Ilex Pharmaceuticals	2001	2001	CHO cells	Indicated as a single agent for the treatment of B-Cell chronic lymphocytic leukemia
<b>OP-1 (US) / Osigraft (EU)</b> <sup>9</sup> Eptotermin alfa (BMP-7)	Stryker (US) / Howmedica (EU)	2001	2001	CHO cells	Indicated to help repair fracture of the tibia (Shin bone)
<b>Replagal</b> Agalsidase beta	Shire Human Genetics Therapies	NA	2001	Human cells	Indicated for patients with Fabry disease; reduces globotriaosylceramide deposition in capillary endothelium
<b>Xigris</b> Drotrecogin alfa (activated)	Eli Lilly	2001	NA		Indicated for the reduction of mortality in adult patients with severe sepsis (associated with acute organ dysfunction)
<b>Helixate FS / Helixate NexGen</b> <sup>10</sup> Octocog alfa (Coagulation factor)	Bayer Schering	2000	2000	BHK cells	Indicated in Hemophilia A for the prevention and control of bleeding episodes

**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Mylotarg</b> Gemtuzumab ozogamicin	Wyeth Pharms Inc.	2000	NA	Myeloma NSO	Chemotherapy agent in the treatment of acute lymphocytic leukemia
<b>Ovidrel</b> Choriogonadotropin alfa	EMD Serono	2000	2001	CHO Cells	Indicated for the induction of final follicular maturation and early luteinization in infertile women
<b>ReFacto</b> Antihemophilic Factor VIII recom	Genetics Institute Inc.	2000	1999	CHO Cells	Indicated in Hemophilia A for the prevention and control of bleeding episodes
<b>TNKase (US) / Metalyse (EU)</b> Tenecteplase	Genentech	2000	2001	CHO Cells	Indicated for use in the reduction of mortality associated with acute myocardial infarction
<b>Eporex / Erypo / Espo</b> <sup>11</sup> Epoetin alfa	Ortho Biologics	1999	NA	CHO cells	Indicated for the treatment of anemia associated with Chronic Renal Failure
<b>Novoseven</b> <sup>12</sup> Coagulation Factor VIIa recomb.	Novo Nordisk Inc.	1999	1996	BHK Cells	Indicated in Hemophilia A and B for the prevention and control of bleeding episodes
<b>Enbrel</b> Etanercept	Immunex	1998	NA	CHO Cells	Indicated to treat moderately to severely active polyarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA)
<b>Herceptin</b> Trastuzumab	Genentech	1998	2000	CHO Cells	Treatment of HER2 overexpression breast cancer
<b>Remicade</b> Infliximab	Centocor Inc.	1998	1999	Hybridoma	Indicated for reducing signs and symptoms inhibiting the progression of structural damage in patients with moderately to severely active rheumatoid arthritis.
<b>Simulect</b> Basiliximab	Novartis	1998	1998	Murine Myeloma	Indicated for the prophylaxis of acute organ rejection in patients receiving renal transplantation
<b>Synargis</b> Palivizumab	Medimmune	1998	1999	Myeloma NSO	Prevent a serious lung disease caused by Respiratory Syncytial Virus (RSV)

**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Thyrogen</b> Thyropin alfa	Genzyme	1998	2000	CHO Cells	Indicated as an adjunctive diagnostic tool for serum thyroglobulin testing or as an adjunctive treatment for radioiodine ablation of thyroid tissue remnants
<b>Benefix</b> Coagulation Factor IX recomb.	Wyeth	1997	1997	CHO cells	Indicated in Hemophilia B for the prevention and control of bleeding episodes
<b>Gonal-F</b> Follitropin alfa	EMD Serono	1997	1995	CHO Cells	Indicated for the induction of ovulation and pregnancy in the anovulatory infertile patient
<b>Leukoscan</b> Sulesomab (Fab')	Immumedics GmbH	NA	1997	Hybridoma	Indicated for diagnostic for determining the inflammation in patients with osteomyelitis
<b>NeoRecormon</b> Epoetin beta	Roche	NA	1997	Cho cells	Indicated for the treatment of symptomatic anaemia associated with chronic renal failure (CRF)
<b>Rituxan (US) / Mabthera (EU)</b> Rituximab	Genentech / IDEC Pharmaceuticals	1997	1998	CHO cells	Cytolytic antibody indicated for the treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma and Rheumatoid Arthritis
<b>Zenapax</b> <sup>13</sup> Daclizumab	Hoffman-La Roche	1997	1999	Murine Myeloma	Indicated for the prophylaxis of acute organ rejection in patients receiving renal transplatation
<b>Avonex</b> Interferon beta-1a	Biogen	1996	1997	CHO Cells	Indicated for the treatment of patients with relapsing forms of multiple sclerosis.
<b>CEA-Scan</b> <sup>14</sup> Arcitumomab	Immunomedics	1996	1996	Hybridoma (Immu4)	Detection of tumours in the body derived from the colon or rectum
<b>Saizen</b> Somatropin recomb.	EMD Serono	1996	NA	Mouse C127 cells	Indicated for the long-term treatment of children with growth failure due
<b>Serostim</b> Somatropin recomb.	EMD Serono	1996	NA	Mouse C127 cells	Indicated for the treatment of HIV patients with wasting or cachexia to increase lean body mass and body weight

**Table S1-E. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009  
(continued)**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>ProstaScint</b> Capromab pendetide	Cytogen	1996	NA	Hybridoma	Indicated as a diagnostic imaging agent in newly-diagnosed patients with biopsy-proven prostate cancer
<b>Verluma</b> Nofetumomab	Boehringer Ingelheim	1996	NA	Mammalian cells	Indicated for the detection of extensive stage disease in patients with biopsy-confirmed small cell lung cancer
<b>ReoPro</b> Abciximab	Centocor Inc.	1994	NA	Murine Myeloma Sp2/0	Indicated as a platelet aggregation inhibitor mainly used during and after coronary artery procedures like angioplasty
<b>Cerezyme</b> Imiglucerase	Genzyme	1994	1997	CHO Cells	Indicated for long-term enzyme replacement therapy for patients with Type 1 Gaucher disease
<b>Bioclote</b> Coagulation Factor VIII recomb.	Baxter HealthCare	1993	NA	CHO cells	Indicated in Hemophilia A for the prevention and control of bleeding episodes
<b>Kogenate FS</b> <sup>15</sup> Antihemophilic Factor recomb.	Bayer Corp.	1993	2000	BHK Cells	Indicated in Hemophilia A for the prevention and control of bleeding episodes
<b>Pulmozyme</b> Dornase alfa	Genentech	1993	NA	CHO Cells	Indicated for the management of cystic fibrosis patients to improve pulmonary function.
<b>Epogen / Procrit</b> Epoetin alfa	Amgen	1989	NA	CHO Cells	Indicated for the treatment of anemia associated with Chronic Renal Failure
<b>Activase / Cathflo Activase</b> Alteplase	Genentech	1987	NA	CHO Cells	Indicated for the restoration of function to central venous access devices
<b>Orthoclone OKT3</b> Muromomab-CD3	Ortho Biotech	1986	NA	Hybridoma	Indicated to reduce the body's natural immunity in patients who receive organ transplants

<sup>1</sup>: RoActemra is also sold as Actemra in Japan

<sup>2</sup>: Xyntha / ReFacto AF (AF= Animal-free) is the new formulation without human products of ReFacto approved in 1999 (EU) or 2000 (US)

<sup>3</sup>: Pergoveris is a combination of two already marketed drugs (Gonal-F and Luveris)

<sup>4</sup>: Follistim was initially approved in 1997 (US) but has been discontinued and replaced by the Follistim AQ

<sup>5</sup>: Advate is the new formulation without human products of Recombinate approved in 1992 and now discontinued

<sup>6</sup>: Trudexa was discontinued in EU in July 2007

<sup>7</sup>: Infuse is now approved in the Infuse Bone Graft treatment to promote fusion of the lower spine vertebrae and in dentistry

<sup>8</sup>: Nespo was discontinued in EU in December 2008

<sup>9</sup>: Previously known as Osteogenic Protein 1

<sup>10</sup>: Helixate was initially approved in 1993 in the US, but is now replaced by the new formulations (FS and NexGen) where human albumin was replaced by saccharose

<sup>11</sup>: Eprex was approved in the US (1999) but is now discontinued. It is sold in EU under this name or Erypo. Espo is the name in Japan

<sup>12</sup>: A NovoSevenRT is also on the market as a room stable formulation

<sup>13</sup>: Zenapax was discontinued in EU in January 2009

<sup>14</sup>: CEA-Scan was discontinued in EU in September 2005

<sup>15</sup>: Kogenate was initially approved in 1993 (US) but is now replaced by the new formulation (Kogenate FS) where albumin was replaced by sucrose

**Table S1-F. Detailed list of recombinant protein drugs produced in mammalian cells discontinued by July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell type	Description
		US	EU		
<b>Dynepo</b> Epoetin delta	Shire Pharmaceuticals	NA	2002	Human cells	Indicated in the treatment of anaemia in patients with chronic renal failure Discontinued in March 2009
<b>Hepacare</b> Vaccine with three Hepatitis B antigens recomb.	Medeva Pharma	NA	2000	Murine Myeloma	Indicated for vaccination against Hepatitis B Discontinued in October 2002
<b>HumaSPECT</b> Votumumab	Organon Teknika	NA	1998	Human lympho- blastoid	Indicated for the diagnosis and staging of colorectal cancer, and other invivo imaging and therapeutic radiopharmaceutical products. Discontinued in 2003
<b>Indimacis 125</b> Igovomab (Fab) <sub>2</sub>	CIS Bio International	NA	1996	Hybridoma /murine ascites	Indicated for the diagnosis of ovarian adenocarcinoma Discontinued in 1999
<b>Myoscint</b> Imciromab Pentetate	Centocor Inc.	1996	NA	Hybridoma	Indicated for detecting the presence and location of myocardial injuries Discontinued in 1999
<b>Tecnemab K1</b> Antimelanoma Mab F(ab') <sub>2</sub>	Sorin	NA	1996	Hybridoma /murine ascites	Indicated for diagnosis of cutaneous melanoma lesions * Discontinued in 2000
<b>OncoScint CR-OV</b> Satumomab	Cytogen	1992	1991	Hybridoma	Indicated as a cancer imaging agent for colorectal and ovarian cancer. Discontinued in 2002

**Table S1-G. Detailed list of recombinant protein drugs produced in transgenic animals on the market on July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Animal	Description
		US	EU		
<b>ATryn</b> Antithrombin recomb.	GTC Biotherapeutics Inc	2009	2006	Goat milk	Indicated for the prevention of thromboembolic events in hereditary antithrombin

**Table S1-H. Detailed list of recombinant protein drugs produced in insect cells on the market on July 1<sup>st</sup> 2009**

Drug commercial name & molecule name	Company	Approval Date		Cell line	Description
		US	EU		
<b>Cervarix</b> <sup>1</sup> Human Papillomavirus type 16 and 18 recomb.	GlaxosmithKline	NA	2007	Hi-5 Rix4446	Indicated to protect against precancerous lesions of the cervix and cervix cancer caused by the human papillomavirus (HPV)

<sup>1</sup>: It is a Baculovirus expression system using the insect cell line is derived from *Trichoplusia ni*

## ANNEXE 2 – Séquences complètes des fragments isolés

### lors des analyses de *Differential Display*

Pour chacun des candidats, l'amorce dégénérée utilisée ainsi que le sens d'insertion dans le vecteur TOPO sont indiqués.

#### A. Candidat DD-A1 (177 pb)

**Amorce : # 23 Direction : antisens**

5' - AAGCTTGGCTATGGAAAGAGATAAAATCAATAAGGAGCGGTTGAAGACTGCTTAGAGTCATCAGAATTCCTATTC  
GGATGTTTCGTCTAGGAATTTGGAGTTCAAAGAAGATGATTGGGTATTCTTGAAGGTTTCCCCCATGAAGGGTGTAAAT  
GCGACTTGGTTAATAAAAAAAAAAGCT- 3'

#### B. Candidat DD-A2 (175 pb)

**Amorce : # 23 Direction : antisens**

5' - AAGCTTGGCTATGGTGGTGTGGTGGCATGGTGGTAGTTGATAATGGCAGACGGTGACAGCAGTTAATAATAAAT  
ATGTGATAGCATCTTAATGAAATTAAGTCTCTGGTATAGATCTTAATCATACAAACCTATTCAGACCCATTAAGTGGT  
TGTGAAGTTAATAAAAAAAAAAGCT- 3'

#### C. Candidat DD-A3 (343 pb)

**Amorce : # 23 Direction : antisens**

5' - AAGCTTGGCTATGGGCTACTGAGGTCGTATTTGATAGCCCGGAAAAATTTTAGGCTTTCGGGGTCTGTGGGCCTG  
GACCCACTCAGGAGGTGTGGGCTATAGCACATGAATATAAGGGAATAAATCGGAATTCTAGTTTTTTTTGTCTGTA AAC  
GCAAAACAATGAGGAACGGCCATGGTGGGGCAGTACTATGGTTCCTTAGGTCATATTTGATGGCTTGGAAAACTTTT  
AGGCAATCCGGTTTAGGGGACCCGGGCCACTCGAAAAGCGAGGGCTAGAGAACACGGAAATACGGGAATCGAGCGG  
AATTCAGTTTTTTTTGGTCTGTAATAAAAAAAAAAGCT- 3'



**D. Candidat DD-A3\* (65 pb)****Amorce : # 23 Direction : sens**5' - AAGCTTGGCTATGTACATATATACTTTTGATTAATACAATTTTAGTTTAATAAAAAAAAAAGCT - 3'**E. Candidat DD-A4 (231 pb)****Amorce : # 22 Direction : sens**5' - AAGCTTTTGATCCTACAAAATTCAATTCAATTATAATATGATTAGCTGCAGTCAAAC TAAATTTAGTAGTAATAT  
CTTCACTCATTAGACGAATCTACTAATTTAGTACATGTTACACTAAATTTTACAAAGATACAATCCATTCCGAATAAA  
TATATCAAATAACCTAATCTCAAATTTTGAATAAAATCGGCTAAATTGAATAACAACTGCACTAAAAAAAAAAGCT  
- 3'**F. Candidat DD-A5 (231 pb)****Amorce : # 22 Direction : sens**5' - AAGCTTTTGATCCTACAAAATTCAATTCAATTATAATATGATTAGCTGCAGTCAAAC TAAATTTAGTAGTAATAT  
CTTCACTCATTAGACGAATCTACTAATTTAGTACATGTTACACTAAATTTTACAAAGATACAATCCATTCCGAATAAA  
TATATCAAATAACCTAATCTCAAATTTTGAATAAAATCGGCTAAATTGAATAACAACTGCACTAAAAAAAAAAGCT  
- 3'**G. Candidat DD-A6 (211 pb)****Amorce : # 21 Direction : antisens**5' - AAGCTTTCTCTGGCAGCAGTTAATTTTCCCTTTTAAATGCATTTTGACTTGTTTTCTTTCTGATCTTCTCTAAAT  
CAATTGATGACTAAAATATGCCAATAAACCTCAATAAATGCCTTAGTTTCTCAACAAAATCATAAAAATCCTAAGTA  
TCAAGAAGAGATAAGTTGGTATATCTTATGAGAGGTTTAAAATAAAAAAAAAAGCT - 3'

**H. Candidat DD-A7 (162 pb)****Amorce : # 21 Direction : sens**

5' - AAGCTTTCTCTGGAACCAATAATTCATGATATGTTGTAATATATATTTTTCTATAAAAGTATTTTGTATAACAA  
 CCTAAAAAATATCAGATACAAACGATACGATTATAGAGATATTTGACTATATATATATAGGGTTGCAAAATTTCTTAAAAA  
AAAAAAGCT-3'

**I. Candidat DD-A7\* (91 pb)****Amorce : # 21 Direction : sens**

5' - AAGCTTTCTCTGGCAGGTGGATAGGCCCAATTACAAAGGAACTCTGTGCGAAATTTTGA AAAATTTATGACTTA  
GTAAAAAAGCT-3'

**J. Candidat DD-A8 (131 pb)****Amorce : # 20 Direction : antisens**

5' - AAGCTTGTGTGCAGAATAGAAAGTACAATGTATTCATTTAGCTTACATGTATTTATTCATACAACCTGTATTTA  
 TTCATTACCCTTCTGTATTCATATAAACTTGTATACTTGTATTAAAAAAGCT-3'

**K. Candidat DD-G1 (251 pb)****Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - AAGCTTACCAGGTATTTAACTAGCATTTTTTCCATTTTTGCACCCTCACCACATTATTTCTGAAGAGTAAATATA  
 AAGATAGTTCAAGAGGGAAATATTGGATATTCAAAAAGGTTATATTATCTGTATAAGAACTTTTACAATATTTATCC  
 GTTGTAATACATAATCTCGCTTATTTATAAGATTACAAATCCGTTTAAGAAAGTTTACATATCATATTAATGACATAA  
 TAGTGCAAAAAAAGCT-3'

**L. Candidat DD-G1\* (198 pb)****Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - **AAGCTTACCAGGT**TGTGGGGCTATTTAATTTAAAGAGCAAACCTTAGATTGAATCAGATGATGGAAGGTAGATGGA  
 CAGTACACAGTGAAGGCAAGATACTAGACTTTATGTGATTAGAATGAATTGGTAGAGAGCTGGCCATGGTGGAAACTT  
 AATTAGAGAACAAACGAACCCCCCCCCCCCC**CAAAAAAAAAAAGCT**- 3'

**M. Candidat DD-G2 (227 pb)****Amorce : # 18 Direction : antisens**

5' - **AAGCTTAGAGGCA**AGGATATCTATATGGGTGCAGAATTCCTTATAGGCATAATATCTACATATGAAAGTGTAGAAT  
 TCCTATCGACAGGATATTTATGTGATATGCAGAGATCAGAAATTCCTATGAGCAGGATATCTACCCCTTTTACATAA  
 ATGGTTACCCCTCCCTTTTCACTAACCATCCCCAAAAGTTATTACAAGTTATTATAGTCC**CAAAAAAAAAAAGCT**- 3'

**N. Candidat DD-G3 (198 pb)****Amorce : # 19 Direction : sens**

5' - **AAGCTTATCGCT**CCGCCTAGACAATATTAATAGTCACCCCTTATCGCTCCTATTGCCACCCTTATCGCTCTTATAT  
 CCACTCTTATCGCTCCGCCTAGAACAATATTTCCAACAAACACAACGACAGTGAAATGCTAACCTTATACCCACATAAT  
 ATCAACAGTGAAATGCCACCCTTATATCCT**CAAAAAAAAAAAGCT**- 3'

**O. Candidat DD-G4 (361 pb)****Amorce : # 21 Direction : antisens**

5' - **AAGCTTTCTCTGG**CTATATATAGTCAGGGTATCCTTACCCTTTGCTTGACTCGACGTCTTCTAGCCACTGATGTG  
 TCTTGGCCATGATTTTAGGCAACACTCTTACCGATTTCGTGGATGTCATAGAGGAAGAATGGAGTAGGCTCTGTTGAC  
 CTTTACTGCCAGTTACTGAGACGGGGTGTGGTCAACTTGGTTCGTGATGTTTCATATTTTGACCAATACGCATACCAA  
 GTCAAGACTTAATTAATTAGCTATACAAATTTCTCTTCTTTTAGTTACACACATCTTCACAAAAGTTTATCTATCTTA  
 CACACACATTTTCTTTATTTTTCAGCTACACTTCTTCC**CAAAAAAAAAAAGCT**- 3'

**P. Candidat DD-G4\* (120 pb)****Amorce : # 21 Direction : sens**

5' - AAGCTTTCTCTGGTTATCAAACGTAGTTAGAAATGAACCCTATAGGTGCCCTAACGCACCTAAAACCGTTAGGTG  
 GCGACTCTTCAAAAAATGTAAACCCCTTCCCAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**Q. Candidat DD-G5 (291 pb)****Amorce : # 22 Direction : sens**

5' - AAGCTTTTGATCCCATCGATTTCATCTTCCTCGATCCTATGCATGTGCTTAACAGTATTATGCAGTTGTTGCATTA  
 ATACCACCAGATGGTAATGTAGTCTAGCATAGTGAATTGTGCCCAAACTCCCAAAGTTCATTGAGTTGTGTTCTTG  
 TATTGTCATTCTTCCTTGTCCCAAAGTGCCTTAATTGCTTTCCTTCTCGAAGGAGATTACCACACTGTAATAATACCC  
 CCCTAAGACTTGAATTTAGGAGTGTGTTTCCCGTATCTCTTCTGCAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**R. Candidat DD-G5\* (167 pb)****Amorce : # 22 Direction : sens**

5' - AAGCTTTTGATCCTTTAGTAACTCATTGATTATGCATTTATCAACTAAAAATTTATTAAGAAACACGTTATCA  
 TCAGTATGGTTTTCTTGCTTTAGGTTCTGCTCCGATTAATAGAAAAGTTGATTAATCAATCCAAACCCCCCCCCCC  
AAAAAAAAAAGCT- 3'

**S. Candidat DD-G6 (233 pb)****Amorce : # 22 Direction : antisens**

5' - AAGCTTTTGATCCCAGTATTAATGACTAAGCACATCTAGTCTTCAATTCGTCTTAATATTAATGTTGGCTATTAA  
 ATTAATTACTCCTACTACAATTTTTGGTATTTATAAATTTATCTAAGAATGAGTTTACGTGGTTTCGTGGAATTTTCTA  
 GAAAGAACATAGCTAAGGAAACAATTTTCGAGTGTAAATGATTATTATGCACGCTCATCTCCCCCAAAAAAAAAAAG  
CT- 3'

**T. Candidat DD-G7 (334 pb)****Amorce : # 23 Direction : sens**

5' - AAGCTTGGCTATGGCCGATGGAAGAACAAGAAGAAGAAATCGAGGGAAGAGAAGAGAGAATAAAAGAGATTGTATGA  
 GAAGATTGTAGTTGTTATTATAATATTCGTAATGTAATACAATCACATATATGTAATGAAATGAGCTATAATGAAAGA  
 TTCCTTTCAACTACTTCTCAACTAACTCTAACTAACTTTTTGGCTCCCTAACTAACTTACGGAAC TAACCAACTAACTG  
 CCACTCTTCTTTATTAAATCCAGCTCACTTATACTATTAATATATCACTAATCACAATTTGTATAATAGTACACCCCC  
 TCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**U. Candidat DD-G7\* (290 pb)****Amorce : # 23 Direction : sens**

5' - AAGCTTGGCTATGAAATGGATTGCACACAGTCAATAATCTCATAAAGCTTCAAAGAGTTTCAATTACCTATTATTA  
 AGAAAAACATTGAACTTACCATATCACAATTGTGTATACTTTCTTCCAAAATTGATAGAGCAAGTAAAGATGTATCA  
 TCACAATAAAAGGCAATAAAATAAGTTCAACAGTATATTGGTACGTTGAATTTAAAGATATTGGATAAGAACAAAAGC  
 AAATAACTGCATTATTTTTTCTGTAGAAGTTTCTGTTCAACCTGCAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**V. Candidat DD-G7\*\* (213 pb)****Amorce : # 23 Direction : antisens**

5' - AAGCTTGGCTATGGAAAGGGCTCACTAATACTCAAGATGATGAAATTGTATTGGTAATTAGTTTTGGTGGTACAA  
 TGCTGTGGGCTAGACATGTTACAACAATTGTTGTGAGCAAGGATCAACTTGACAACCTGTGCTTATGGGCTAGACATG  
 TTACCTATTGGATTAGTCAGATGCATACTAACTGGTCTAGATACCCAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**W. Candidat DD-G8 (307 pb)****Amorce : # 23 Direction : sens**

5' - AAGCTTGGCTATGTATAGAAGTTCCAATGGAGGTCCCTATTACACCATTCATTTTCAATTGGCCAACATAAACAGG  
 AAATTCAATTATGAAGAGGTCCATTTTCCATGCAAAAAGTTGTGGCAGATTAGGACATTCAATGGCCCTCATGCAACTATA  
 CAAAGCAACAAAGAAAATCTTCCAATCCAGAAGGGGATAGTGTCACTAGCCAATCCAAGGCATTAGATACTTCCAATT

CTAGCATGCAAATAGGATCTCTACTGCCCAAAGAGGATGCCTGACACACTGTTGCTTTCCCAAAAAAAAAAAGCT-  
3'

### X. Candidat DD-C1 (90 pb)

**Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - AAGCTTACCAGGTTATGCTAGAAAAAGGACCGGGTTATGTCCGAAAAGAAAAAAAAAGGTCCTCGAGTTATGCCGG  
GAAAAAAAAAAGCT-3'

### Y. Candidat DD-C1\* (52 pb)

**Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - AAGCTTACCAGGTGGGGATCTTTGTTGTGGGATTATGGAAAAAAAAAAGCT-3'

### Z. Candidat DD-C3 (190 pb)

**Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - AAGCTTACCAGGTACGAGGGGAGAGACGGGAGTCCAAGGTGATGATGAATCCTCAGTCTAAGCGGAAAAAGAACC  
TAAGCCGACAAGGGTTTATCAGATAACAGGGCAGACCTCCCAAATTCAGCTTGTAAATGTTCCCGATATAGGTGGT  
GATGAAC TGAATCTGATGCGTCAAAAAAAAAAGCT-3'

### AA. Candidat DD-C4 (127 pb)

**Amorce : # 18 Direction : antisens**

5' - AAGCTTAGAGGCAGTATCACCGAGACCGGGTTGTCCGATTTGACTCTGCGAGTGTCTAGATAGAGATGTCCC  
CTAGTTATCGCTTGT TAGCACCGCAGTATTCACCTTTGGAAAAAAAAAAGCT-3'

**BB. Candidat DD-C4\* (80 pb)****Amorce : # 18 Direction : sens**

5' - AAGCTTAGAGGCATACTCCCAATGACCTTGAACGTTGGAAGACTTTTCTGACGGAAGACCCCCCTCGAAAAAAAAA  
AAGCT-3'

**CC. Candidat DD-C5 (81 pb)****Amorce : # 18 Direction : sens**

5' - AAGCTTAGAGGCATACTCCCAATGACCTTGAACGTTGGAAGACTTTTCTGACGGAAGACCCCCCTCGAAAAAAAAA  
AAAGCT-3'

**DD. Candidat DD-C6 (425 pb)****Amorce : # 19 Direction : antisens**

5' - AAGCTTATCGCTCCCAGGGGGTGCAGATTCATAATAGGCATCTAGAAATTATTGTACGTCAAATAACATCAAAAG  
TGTGGTTTTTCAGAAGATGGAATGTCTAATGTTTTTTTACCCCGGAGAACTTATTGGATTGTTGCGAGCAGAACGAATGG  
GGCGCGCTTTGGAAGAAGCGATCTGTTACCGAGTCGTCTTATTGGGAATAACAAGAGCATCTCTCAATACTCAAAGTT  
TCATATCTGAAGCGAGTTTTTCAAGAACTGCTCGAGTTTTAGCAAAGCGGCTCTCCGGGGTCGTATCGATTGGTTGA  
AAGGCCGTGAAAGAGAACGTTGTTTTGGGGGGGGTGATACCCGTTGGTACCGGATTCAAGGGATTAGTGCACCCTTCAA  
AACACATAACAACATTCC'TTTGGAAAAAAAAAAAAAGCT-3'

**EE. Candidat DD-C6\* (245 pb)****Amorce : # 19 Direction : antisens**

5' - AAGCTTATCGCTCAGGAGCGGAGGGGCATGACACTGAAGATTGTTGGACCCTTAAGAGAGTAGTTGAAAATCTGA  
GAGAACAGAAGCTGGTAGTGTGAGGGACGAAGAAGCCCCCAATGTAACATAACAACCCACTGCCGGCTCACAATAACG  
GGACGGTCATTGGGATGATATGTGAGGACAAAGAATTCGACCCAGCTTTGAAAGCTATCGTTGCTATCACTGACTCGG  
AAAAAAAAAAAAAGCT-3'

**FF.Candidat DD-C7 (99 pb)****Amorce : # 17 Direction : antisens**

5' - AAGCTTACCAGGTCATATGATATTCAGAAGCTCAGTCTCTGATCACATATTCAGAGTTTGAAAGGCAATAAGCGA  
AATTTTCTGGAAAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**GG. Candidat DD-C7\* (40 pb)****Amorce : # 17 Direction : sens**

5' - AAGCTTACCAGGTCAAGGCGCAACTGAAAAAAAAAAAAAGCT- 3'

**HH. Candidat DD-C8 (50 pb)****Amorce : # 22 Direction : sens**

5' - AAGCTTTTGATCCATCATTAAACCCCTCCCCCCCGAAAAAAAAAAAAAGCT- 3'



## ANNEXE 3 – Séquences complètes des fragments isolés

### lors du 5'-RACE

Pour chacun des candidats, les amorces utilisées ainsi que le sens d'insertion dans le vecteur TOPO sont indiqués.

#### A. Candidat DD-A1 Clone # 3 (578 pb)

Amorces : 2 x UAP Direction : antisens

5' - CTACTACTACTAGGCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGCGTGAATCAGAAGCGGGGCACTGCCCCCTCCT  
 TTTGGACCCAAGGCTTGCTTGCAGGCCGATCCGGGCGGAAGACATTGTGAGGTGGGGAGTTTGGCTGGGGCGGCACAT  
 CTGTTAAAAGATAACGCAGGTGTCTTAAGATGAGCTCAACGAGAACAGAAATCTCATGTGGAACAGAAGGGTAAAAGC  
 TCGTTTGATTCTGATTTCCAGTACGAATACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTAACGATCCATTAGACCTTCGGAATTCTGA  
 AGCTAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCATAGCGACGTTGCTTTTTG  
 GTCCTTCGATGTCGGCTCTTCCATCATTGTGAAGCGGAATTCACCAAGTGTGGATTGTTACCCACCAATAGGGAA  
 CGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTACCCTACTGATGACAGTGTGCAATAGTAATTCAACCT  
AGTACTAGTCGACGCGTGGCCTAGTAGTAGTAG- 3'

#### B. Candidat DD-A1 Clone # 8 (346 pb)

Amorces : A1-GSP3 et UAP Direction : antisens

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGAACAGCCAACCTCAGAACTGGTACGGAC  
 AAGGGGAATCCGACTGTTTAATTTAAAACAAAGCATTGCGATGGTCCCTGCGGATGTTTACGCAATGTGATTTCTGCC  
 AGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAAGAAATTCAACCAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTA  
 GCCAAATGCCTCGGCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTCCCTGTCTACTATCCAG  
 CGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCGTGTTGAGCTTGGCTATGGAAAGAG  
ATAAAAT- 3'

### C. Candidat DD-A1 Clone # 10 (1093 pb)

**Amorces : 2 x UAP Direction : antisens**

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGCGAGGCCCGTACTTCCCCAGTACCCGGC  
TATTGCAGNTAGGAGGAGGAGAAAATGTCTCNCNGGANGTTTGAGCCTCCAAGNTTCGCTTCTTTGGGATTTCTNCCC  
NGGANCTTGC'TGCCCGACCCNGGGAAAGGTGAAGNTTTCANAGGATGATCCNCACCNCCC'TGCAAGCTAACTGCC  
TTCTTGGGNTACCCAGCGGGCATGACTCACATTGTCNNGNNGAAAACNNGATNAAACTCNCANGAANAGACANGGN  
AGCNGNNCATCENNAANCACTCCAATGGTGANTGTTGGTGTGTTGGGTATGTGAAGNCACNTNNTGGTNTTNGTTNN  
TGAACACNGTCTGGGCTCAACATNTCAGTGAAGAGCTTAAGAGGAGGTTNTACAAGAAGTGGTGCAAGTCCAAGAAGA  
AGGCNNTCTTGAAATACTCCAAGAAATATGAATCNGATGAAGGGAAAAAGGACATCCAGACACAGCTGGAGAAATTGA  
AGAAGTATGCATGCGTCATCCGTGTTTTGGCTCACACTCAGATAAGGAAGATGAANGGTCTGAAACAGAAGAAAGCCC  
ATTTGATGGAGATACAGGTGAATGGTGGGACAATTGCTCAGAAGGTTGACTTTGCATATGGTTTTCTTCGAGAAGCAGG  
TTCCAGTTGATGCTGTTTTTTCAGAAGGATGAGACGATTGACATCATTGGTGTCCCAAGGGTAAGGGTTATGAAGGTG  
TTGTAACCTCGTTGGGGTGTGACACGTCTTCTCGCAAACCCACAGGGTCTGCGTAAGGTTGCTTGTATCGGTGCC  
GGCACCC'TGCTAGAGTTTTCTACACAGTTGCCCGTGTGGTCAAAATGGATACCATCACCGTACCGAGATGAACAAGA  
AGGTTTACAACTAGGGAAGGCTGGCCAAGAGTCCCATGCTGCTGTAAC'TGATTTTGACAGGACCGAGAAAGACATTA  
CTCCCATGGGTGGATTTCCCCATTATGGTGTGGTGAAGGATGATTACCTGTTGATCAAGGGATGCTGTGTTGGTCCTA  
AGAAGAGGGTTGTAACCC'TTCGTTCAGTCCCTGCTCAACCAGACCTCTCGTGTACTAGTCGACGCGTGGCCTAGTAGTA  
GTAG-3'

### D. Candidat DD-A1 Clone # 11 (132 pb)

**Amorces : A1-GSP3 et UAP Direction : sens**

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGACTGGACGAGGCAGCAGGCAGCGCCGGGA  
CGAGGTTGATGAAGCAGAAGGCAGCGCAGTAGCAGCTGCGTGAGCAACAATGGCGACTGGCCATGGCGAGGGTGAGCA  
GCTTGGCTATGGAAAGAGATAAAAT-3'

**E. Candidat DD-A2 Clone # 3 (561 pb)****Amorces : 2 x UAP Direction : sens**

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGACACGGACCAAGGANNNNGACATGTGTCTN  
 GAGTCAACGGGNGAGTAAACCGGTAAGGCGTAAGGAAGCTGATTGGTGGGATCCCCCTGAGGGGTGCACCCGNGACCG  
 ACCTTGATCTTCTGTGAAGGGTTCGAGTGTGAGCATAACCTGTCGGGACCCGAAAGATGGTGAACATATGCC'NAGCCGG  
 GCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCCCGCAGCGATACTGACGTCCAAATCGTTCGTCTGACTTGGGTATAGGGG  
 CGAAAGACTAATCGAACCGTCTAGTAGCTGGTTCCTCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCTGGAGCTCGCGTGCGAGTT  
 CTATCGGGTAAAGCCAATGATTAGAGGCATCGGGGGCGCAACGCCCTCGACCTATTCTCAAAC'TTAAATAGGTAGGA  
 CGGTGCGGCTGCTTTGTTGAGCCGCACCACGGAATCAAGAGCTCCAAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAAC'TGGCGA  
 TCGGGGATGAACCGGAAGCCGGGTTACGGTGCCAAACTGCGCGCTAACCTAGATCCACAAAGGGGTACTAGTCGACGC  
GTGGCCTAGTAGTAGTAG-3'

**F. Candidat DD-A2 Clone # 6 (287 pb)****Amorces : A2-GSP3 et UAP Direction : antisens**

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGCGAGATTCCCACTGTCCCTGTCTACTATCCA  
 GCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCC'TGCTGAGCTTGACTCTAGTCCGA  
 CTTTGTGAAATGACTTGAGAGGTGTAGTATAAGTGGGAGCCGAAAGGCGAAAGTGAATACC'ACTACTTTT'GACGTTA  
 TTTTACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGGCACTGCCCTCTTTTTGGACCCAAGGCTTGCTTGCAGGCCGATCCGGG  
 CGGAAGACATTGTCAGGTGGGGAGCTTGGCTATGGTGGTGTGGT-3'

**G. Candidat DD-A2 Clone # 7 (60 pb)****Amorces : A2-GSP3 et UAP Direction : antisens**

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTGTACGGGGGGGGGGGGCGACTATGGTTGAGGATGGGGGTAGTGGTGGC  
 GACTAAGCTTGGCTATGGTGGTGTGGT-3'

**H. Candidat DD-A2 Clone # 8 (255 pb)****Amorces** : A2-GSP3 et UAP **Direction** : antisens

5' - CTCTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGTATAGTTAACAATGGCGGGTGGTGAT  
 TTGTGATTGAGGAAGGTCGTGGTAGGTTATAATGATGGGCGATGCCGGCTGTGGTAGTTAATAGTGATGGAGTGGTTG  
 GTTGTGGTAGTTGAGGTGGATAAGTGTGACTGTGAGTGAGAATGATGGTGGTCCGAGTGGTGGGGATGATGGATGGT  
 GATGGTCGATAATGGTGGTGACTATGATTGAGGATGATGGTGGTGGTGGAGCTTGGCTATGGTGGTGGT-3'

**I. Candidat DD-A3 Clone # 6 (181 pb)****Amorces** : A3-GSP3 et UAP **Direction** : antisens

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGAGGGGGGTACCAAAAAGAAAACAAACAGGAGTCT  
 GATTTGATTTGAATTTTGAATCTCCGGCGATGGGACGGGCTGAGATGGTGGTAGGCCCGTCGGCGGCGGCGGCGCGG  
 TACCACCTGAAGAATGAGGCAATTAGTTGGTGGGAAGAGGCGAACAGATCTCGAGCTTGGCTATGGCTACTGAGGT-  
 3'

**J. Candidat DD-A3 Clone # 7 (537 pb)****Amorces** : A3-GSP3 et UAP **Direction** : antisens

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGATGCCGGTTCGTTCTACTACGGA  
 AGCTATCCACCTTATCAGGAGGTTGGTGGAAACAGTACATGGATAGGAAAAGGGATTTGCACACGGTGTATTATTGACCT  
 AGAGAAAGCGTATGACAAGGTCCCTATGGAGGTTCTTTGGAGATGTCTGCAGGTGAAAGGTGTGTCCGTAGCTTACAT  
 TTGGGTGATAAAGGATATGTATGATGGAAC TAAGACTCGGGTTAAGACTGTGGGAGGTGGGAGGTGACTCAGAGCATT  
 TTCTGTTTGTATGAGGTTATAACCAAGGATCTGCGCTCAGCATGTTCTTATTTTCCCTGGCGATCGATGCACTAACAC  
 ACCATATTCAAGGGGAGGTGCCATGGTGTATGTTGTTTCGCTGATGATATATTGATAAGACGCGAGGCGGCGTTAATGA  
 GAGTGGAGGTTGGAGACAAGCCCTGGAGTCGAAAGGTTTCAAGTTGAGTAATCTGGAGTGCAAGTTCAGCGACGTGAC  
 GGGGAAGCGGACATGGAAGTGAAGCTTGGCTATGGCTACTGAGGT-3'

**K. Candidat DD-A3 Clone # 9 (45 pb)****Amorces :** A3-GSP3 et UAP **Direction :** antisens

5' - CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGTTAGGCTTTCGGGGTCCTGTGGAGCTTGGC  
TATGGCTACTGAGGT - 3'

**L. Candidat DD-G8 Clone # 2 (537 pb)****Amorces :** G8-GSP2 et AAP **Direction :** antisens

5' - GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGAGAGAGCTCTAACAGGCCCTTGGAGGACCGAACCCACGTA  
TGTGGCAAAATACGGGGATGACTTGTGGCTAGGGGTGAAAGGCCAACCAAGATCGGATATAGCTGGTTTTCCGCGAAA  
TCTATTTTCAGTAGAGCGTATGATGTTCGATGGCCCCGAGGTAGAGCACTCAATGGGCTAGGGTGGCCTCATTTTCGCCTTA  
CCAACCCAGGGAAACTCCGAATACAGGCC TAGATCGTTTTGTACAGACAGACTTTTTGGGTGCTAAGATCCAAAGTCG  
AGAGGGAAACAGCCCAGGTTCGTACGCTAAGGTCCCTAAGCAATCACTTAGTGGAAAAGGAAGTGATCGAGCGATGACA  
ACCAGGAGGTGGGCTTGAAGCAGCCATCCTTTGAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTCTAGCTCCATGGCACCGAAA  
ATGTATCAGGGCTCAAGTGATTCACCGAAGCGACGAGACCTCGAAAGCTGCTTTTTCAAGTGTTCAGTAGCGGAACGTT  
CTGTCAAATCGAGGGAAGAGAAGAGAGAATA - 3'

**M. Candidat DD-G8 Clone # 4 (667 pb)****Amorces :** G8-GSP2 et AAP **Direction :** antisens

5' - GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGCTCTCTGGGGAGGCACACCTTCACTTCCTTCTTAATGAA  
GGGGTTCCCCGGGAGTCTGACCTTGTCTTTCTTTTAATTGTTCGGGGCCGTCATGAGTGCCGAAACCGATTTCCGGTAA  
GATGATGATGGCTCCTTCGGGCGCATCAAGCTCTGAAGATCCAAACTGGACGGAAGCCCTGAGATCTTCTAAAGGGCA  
GGGAGAGACTTCAGAAAGGGAAAGCACAGGCACATCGTTCGTCATCAACCTACAAAAAGAAAGAGCACGTCCGGCGCC  
TGCCCCGAATGAAGTAGCTTCCCCTGCCCTGTTCGTCCTTTCCATATCAAGAAGATGAGATCATAGGGGGCGACGG  
TGTAGAAAGCATCCAACAGCGGCCCTTTGAGTTTGAAGGAGAAAAACCCCTCCTTCTGCCGAGGTCATACATCATAACA  
AGGCCCGAATTGAAGCCGAAGACCTATTCGAGGTCAAGGTTCGATATTTTCAGGGTCATGTCTGGCCTTGGTCCAGAAG  
GAGATTGGCTGGGACGGGGAGCTCGGGCCCTCGAGAATCCGCGTACCGCCACGGGAGAGCATTCTTGGAGAAACTCC  
ATACCCCTCTTTTCGGATCTCGAATCGAGGGAAGAGAAGAGAGAATA - 3'

**N. Candidat DD-G8 Clone # 10 (301 pb)****Amorces : G8-GSP2 et AAP Direction : antisens**

5' - GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGCACAGACAGACTTTTTGGGTGCTAAGATCCAAAGTCGAG  
 AGGGAAACAGCCCAGATCGTACGCTAAGGTCCCTAAGCAATCACTTAGTGAAAAGGAAGTGATCGAGCGATGACAAC  
 CAGGAGGTGGGCTTGAAGCAGCCATCCTTTGAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTCTAGCTCCATGGCACCGAAAAT  
 GTATCAGGGCTCAAGTGATTCACCGAAGCGACGAGACCTTGAAAGCTGCTTTTTCAAGTGTGATGAGCGGAACGTTCT  
 GTCAATCGAGGGAAGAGAAGAGAGAATA - 3'

**O. Candidat DD-G8 Clone # 12 (1020 pb)****Amorces : G8-GSP2 et AAP Direction : sens**

5' - GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGCAAGCCGCCCTTTAAAGGAGCGGGCGCAGTGAACGTGAA  
 TTGTGAAAAGATTGGAANATCTGGCCAAAGAAGGTGATAGCCCTGTANATTCGTTCCCATGGTTCGATCCTTCCCAGT  
 AAAACGCGGCGTGTTCGAATTCGATCGCTTTTACGCGAGAAAGGGGNCCACCCTCTANCCTAAGTATCCTCAATGA  
 CCGATAGCGTACAAGTNCCGTGAGGAAAGGTGAAAAGAACCCTATTAGGGAGTGCAATAGAGAACCCTGAGATCCGAT  
 GCGAACAATCAGTCAAGGAGCGGAGCTTAGAGCCTTTACTTTATGTAAAGCGCACTCACTCTAACGGCGTNCCTTTT  
 GCATGATGGGTGAGCGAGGAAATGGGAACAGCGGCTTAAGCCATTAGGTGTAGGCGCTTTCAGAGGTGGAATCTTCT  
 AGTTCTTCCCTATTTGACCCGAAACCGATCGATCTAGCCATGAGCAGGTGAAGAGAGCTCTAACAGGCCTTGGAGGAC  
 CGAACCCACGTATGTGGCAAAATACGGGGATGACTTGTGGCTAGGGGTGAAAGGCCAACCAAGATCGGATATAGCTGG  
 TTTTCCGCGAAATCTATTTTCAAGTAGAGCGTATGATGTGATGGCCCGAGGTAGAGCACTCAATGGGCTAGGGTGGCCT  
 CATTTCCGCTTACCAACCCCAGGGAAACTCCGAATACAGGCCTAGATCGTTTGTACAGACAGACTTTTTGGGTGCTAA  
 GATCCAAAGTCGAGAGGGAAACAGCCCAGATCGTACGCTAAGGTCCCTAAGCAATCACTTAGTGAAAAGGAAGTGAT  
 CGAGCGATGACAACCAGGAGGTGGGCTTGAAGCAGCCATCCTTGAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTCTAGCTCC  
 ATGGCACCGAAAATGTATCAGGGCTCAAGTGATTCACCGAAGCGACGAGACCTTGAAAGCTGCTTTTTCAAGTGTGATG  
 TAGCGGAACGTTCTGTAATCGAGGGAAGAGAAGAGAGAATA - 3'

## ANNEXE 4 - Procédure d'opération normalisée pour la transformation de cellules de plantes

	<b>BIO-P<sup>2</sup> Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b>  Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefasciens</i>	<b>Date Effective :</b>  Février 2007	<b>Préparé Par :</b>  Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b>  Numéro            0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b>  1 de 8

1	<b>OBJECTIFS</b> .....	2
2	<b>CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION</b> .....	2
3	<b>RESPONSABILITÉ</b> .....	2
4	<b>SÉCURITÉ ET CONSIGNES PARTICULIÈRES</b> .....	2
5	<b>PRINCIPES</b> .....	2
6	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	4
7	<b>MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS</b> .....	5
8	<b>MODE D'OPÉRATION</b> .....	5
	PRÉPARATION DES CELLULES DE TABAC (JOUR 0) .....	5
	PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D' <i>AGROBACTERIUM</i> (JOURS 4 ET 5).....	6
	CO-CULTIVATION DES CELLULES DE TABAC AVEC <i>AGROBACTERIUM</i> .....	6
	ÉTALEMENT ET SÉLECTION DES CELLULES TRANSFORMÉES (JOUR 7) .....	7
9	<b>CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES</b> .....	7
10	<b>FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS</b> .....	8

	<b>BIO-P<sup>2</sup> Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b>  Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro            0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 2 de 8

## 1 OBJECTIFS

Cette procédure d'opération normalisée s'applique à la transformation de cellules de tabac NT1 par *Agrobacterium tumefaciens* dans le but d'obtenir des lignées stables.

## 2 CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION

Cette méthode s'applique aux cellules de tabac NT1 en culture au laboratoire.

## 3 RESPONSABILITÉ

Il est de la responsabilité de chaque utilisateur de suivre les instructions de cette PON,

## 4 SÉCURITÉ ET CONSIGNES PARTICULIÈRES

Toujours porter des gants en manipulant *Agrobacterium* puisque certaines études tendent à démontrer qu'il serait éventuellement possible qu'on transfère d'ADN se fasse entre la bactérie et des cellules autres que végétales (bactéries, levures et mammifères).

## 5 PRINCIPES

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie que l'on retrouve communément dans le sol. Dans la nature, elle est responsable de la maladie « Crown gall disease » (Figure 1). Apparentée au genre *Rhizobium*, elle provoque également la croissance d'excroissances sur les plantes infectées. Contrairement au genre *Rhizobium* qui contribue à fournir de l'azote à la plante, cette bactérie peut être considérée comme un parasite puisque qu'elle utilise les ressources de la plante pour se nourrir et se développer.



Figure 1. Maladie de la « Crown Gall » causée par *Agrobacterium tumefaciens*.

Son mécanisme d'infection est simple. *Agrobacterium* possède un plasmide, nommé Ti (Tumor-inducing) sur lequel se trouve une séquence d'ADN qui peut aller s'insérer dans le génome de la cellule végétale hôte. Sur le plasmide Ti naturel, on retrouve également les gènes *vir*, dits de virulence puisqu'ils sont impliqués dans le mécanisme d'insertion du T-DNA (Transferred-DNA). Les gènes que l'on retrouve sur ce bout d'ADN codent, entre autres, pour des gènes impliqués dans la synthèse



	<b>BIO-P<sup>2</sup> Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro 0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 3 de 8

d'opines, des dérivés d'acides aminés. Ces molécules sont ensuite utilisées presque exclusivement par les bactéries comme source d'azote. Sur le T-DNA, on retrouve également des oncogènes. C'est gènes codent pour une cytokinine, la nopaline, qui induit une croissance anarchique des cellules d'où la formation de la galle.

Cette bactérie est en mesure d'infecter une très grande variété de plantes ce qui explique pourquoi elle constitue le vecteur le plus efficace connu pour obtenir des plantes transgéniques (Tzifira, T. and Citovsky, V., 2006). Les études faites en ce sens ont démontrés que 56 % des gymnospermes (ex : les conifères) et 58 % des angiospermes (ex : plantes à fleurs, cactus, graminées et arbres feuillus) pouvaient être transformés par cette bactéries (Lacroix, B. and Tzifira, T., 2006). Toutefois la grande famille des angiospermes qui décompte plus de 250 000 espèces répertoriées peut être subdivisée en plantes monocotylédones et dicotylédones. Les dicotylédones se prêtent mieux à la transformation puisque seulement 8 % des espèces de monocotylédones testées ont été transformées. À titre indicatif, on retrouve dans cette sous-catégorie les céréales cultivées par l'homme : riz, maïs, blé, orge, avoine, millet, seigle, etc...). Certains types de plantes sont entièrement réticents à l'infection par cette bactérie. Aucune plante des familles *Bryophytae* (mousses) et *Pteridophytae* (fougères) ne semblent pouvoir être transformées (Lacroix, B. and Tzifira, T., 2006).

Selon Tzifira et Citovsky (2006), le mécanisme de transformation cellulaire par *Agrobacterium* peut se décrire en 10 étapes (voir figure 2). Un détail important à noter est la similitude de certaines étapes avec le processus de conjugaison bactérienne (échange de matériel génétique entre deux bactéries (Lacroix, B. and Tzifira, T., 2006). La cellule bactérienne doit reconnaître et s'attacher à la cellule hôte (1). Cette interaction se fera par des récepteurs situés à la surface des cellules impliquées. Un signal émis par la cellule végétale sera capté par le système VirA/VirG (2). Le signal sera donc transmis par ce système et les gènes *vir* seront activés (3). Plusieurs recherches ont démontré que divers composés phénoliques pourraient constituer le signal déclenchant la virulence de la bactérie (Baker, C. J., Mock, N. M., *et al.*, 2005). Ces composés phénoliques seraient synthétisés par la plante en réponse à une blessure. Ces molécules, ayant initialement pour but de protéger la cellule d'éventuelles attaques pathogènes seraient en quelque sorte le signal indiquant à la bactérie une opportunité pour agir. Le composé majeur est que l'on retrouve généralement est l'acétosyringone (Lee, K., Dudley, M. W., *et al.*, 1992). Le complexe protéique virD1/D2 génère ensuite une copie du T-DNA (3). Cette copie mobile du T-DNA est simple brin. Sous la forme d'un complexe VirD2-ADN, le T-DNA est déplacé vers le pont reliant les deux cellules (4). C'est à ce moment qu'il sera recouvert de protéines VirE2 et deviendra le complexe-T mature. Il se dirigera ensuite dans le cytoplasme de la cellule hôte et sera admis dans le noyau par un système de transport actif (7).

	<b>BIO-P<sup>2</sup></b> <b>Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro 0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 4 de 8

Le T-DNA se déplace ensuite vers son site d'intégration (8); il sera débarrassé de ses protéines protectrices (9) pour finalement s'insérer au génome de l'hôte.

Le mécanisme d'infection et de transformation d'*Agrobacterium* se sert de la machinerie cellulaire de l'hôte.

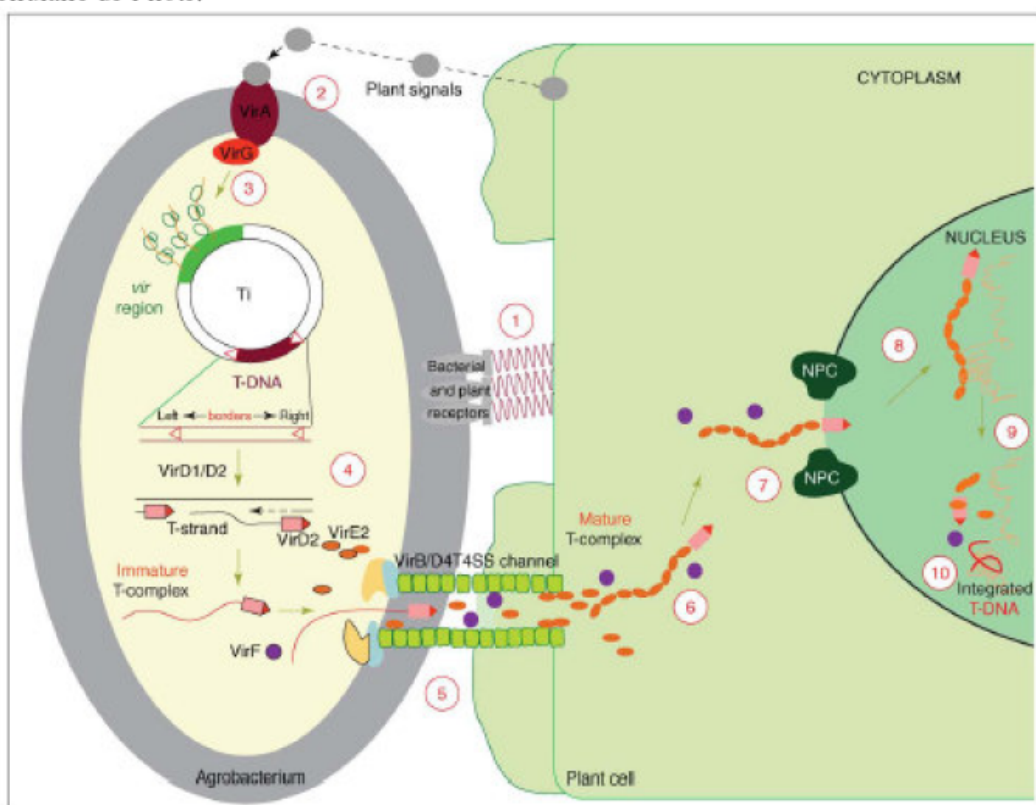


Figure 2. Modèle du mécanisme de transformation cellulaire par *Agrobacterium*

## 6 RÉFÉRENCES

Baker, C. J., Mock, N. M., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Rice, C. P., Deahl, K. L. and Aver'yanov, A. A. (2005). "Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition." *Biochemical and Biophysical Research Communications*(328): 130-136.

	<b>BIO-P<sup>2</sup> Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefasciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro            0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 5 de 8

Lacroix, B. and Tzfira, T. (2006). "A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners." TRENDS in Genetics **22**(1): 29-37.

Lee, K., Dudley, M. W., Hess, K. M., Lynn, D. G., Joerger, R. D. and Binns, A. N. (1992). "Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: Identification of phenol-binding proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 8666-8670.

Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006). "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology." Current Opinion in Biotechnology **17**: 147-154.

## 7 MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS

- Lignée d'*Agrobacterium tumefasciens* (LBA4404, C58C1 ou AgL1) ayant un plasmide avec le T-DNA contenant la construction à insérer.
- Acétosyringone à 21.2 mM
- Spectrophotomètre
- Cuve à spectrophotomètre
- Erlenmeyer de 50 ml
- Incubateur/agitateur à 27-28 °C
- Tubes en verre pour cultures bactériennes
- Pétris (petits et standards)
- Milieu MS Tabac solide
- Antibiotiques (Céfotaxime + Antibiotiques spécifiques à la construction)

## 8 MODE D'OPÉRATION

### Préparation des cellules de tabac (Jour 0)

- 8.1.1 Inoculer un flacon de milieu KCMS frais avec des cellules de tabac NT1 (ratio = 1/10).
- 8.1.2 Incuber le flacon toute la semaine à 25-27 °C pendant 5 jours. (\*\* Les cellules de tabac NT1 sont habituellement passées le vendredi. Par conséquent, elles seraient prêtes le mercredi suivant)

	<b>BIO-P<sup>2</sup> Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefasciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro            0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 6 de 8

#### Préparation de la suspension d'*Agrobacterium* (Jours 4 et 5)

- 8.1.3 Inoculer un tube de 3 ml de milieu LB contenant les antibiotiques pour la sélection de la souche et de la construction.
- 8.1.4 Incuber le tube toute la nuit à 27-28 °C sous agitation.
- 8.1.5 Doser la suspension bactérienne au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.
- 8.1.6 Préparer une suspension d'*Agrobacterium* à une D.O. de 0.8 en diluant avec du milieu LB frais.

#### Co-cultivation des cellules de tabac avec *Agrobacterium*

- 8.1.7 Prélever le volume de cellules NT1 approprié et le mettre dans le pétri ou dans l'erlenmeyer de 50 ml.
- 8.1.8 Ajouter la suspension d'*Agrobacterium* à une D.O de 0.8
- 8.1.9 Ajouter l'acétosyringone à 21.2 mM (la concentration finale sera de 100 uM).

	Recette simple	Recette double
Cellules NT1	5,00 ml	10,00 ml
Suspension D'Agro (D.O. = 0.8)	200 ul	400 ul
Acétosyringone (21.2 mM)	25 ul	50 ul
Total :	5,225 ml	10,45 ml

\*\*La recette simple se fait habituellement dans les plus petits pétris, alors que la recette double se fait dans les erlenmeyers 50 ml.

	<b>BIO-P<sup>2</sup></b> <b>Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro 0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 7 de 8

8.1.10 Incuber les pétris scellés au parafilm ou les erlenmeyers à 27-28 °C sous agitation pendant deux jours.

#### Étalement et sélection des cellules transformées (Jour 7)

- 8.1.11 Récolter les cellules et les transférer dans un tube falcon de 15 ml stéril.
- 8.1.12 Ajouter 5 ml de milieu KCMS frais avec 200 ng/ml de Cefotaxime + l'agent de sélection de cellules transformées (Hygromycine = 50 ng/ml, mais Kanamycine est 200 ng/ml)
- 8.1.13 Agiter délicatement en inversant le tube quelques fois et incuber à température pièce pendant 10 min.
- 8.1.14 Centrifuger les cellules légèrement pendant 1 min à 1000 rpm.
- 8.1.15 Enlever le surnageant.
- 8.1.16 Répéter les étapes 12 à 15 un total de 3 fois.
- 8.1.17 Resuspendre les cellules dans un volume final de 10 ml
- 8.1.18 Étaler 5 ml de cellules par pétris MS Tabac + Antibiotiques (céfotaxime et agent de sélection). L'excédent de milieu liquide permet de répartir les cellules sur la surface du pétri.
- 8.1.19 À l'aide d'une pipette, retirer l'excès de liquide de la surface du pétri.
- 8.1.20 Sceller les pétris avec du parafilm et l'incuber à 27-28 °C. Une croissance devraient pouvoir être observée entre une semaine et demie et deux semaines. À ce moment, des repiquages afin d'isoler quelques lignées seront nécessaires.

## 9 CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES

- Présence d'*Agrobacterium* sur les pétris: Les lavages sont normalement efficaces pour retirer la majeure partie d'*Agrobacterium*. Si vous en observez sur vos pétris, un

	<b>BIO-P<sup>2</sup></b> <b>Ecole Polytechnique</b>	Procédure d'opération normalisée	
<b>Titre :</b> Transformation de cellules NT1 par <i>Agrobacterium</i> <i>tumefasciens</i>	<b>Date Effective :</b> Février 2007	<b>Préparé Par :</b> Éric Boivin	<b>Section:</b>
	<b>Révision</b> Numéro            0	<b>Approuvé Par :</b>	<b>Page:</b> 8 de 8

repiquage plus hâtif pourrai limiter la contamination. Dans le cas contraire, recommencez en lavant avec des volumes de milieu frais avec antibiotiques plus grands et augmentez le temps d'incubation avec les solutions de lavage.

•  
**10 FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS**