



Diversión dirigida du métabolisme cellulaire chez le tabac sauvage *Nicotiana benthamiana* utilisé comme hôte pour l'expression hétérologue de protéines d'intérêt clinique

**Thèse**

**Stéphanie Robert**

**Doctorat en biologie végétale**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Stéphanie Robert, 2015



# Résumé

La moléculaire végétale est une alternative abordable et sécuritaire pour la production de protéines recombinantes d'intérêt clinique. Cependant, ces protéines sont souvent sujettes à la dégradation par les protéases endogènes dans les cellules végétales. Plusieurs stratégies ont été mises en place pour contrer ce phénomène, incluant notamment la co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons. Peu de données ont décrit toutefois comment la physiologie de la plante hôte, associée en particulier à son développement, a un impact sur l'expression et la protection d'une protéine d'intérêt. Dans ce projet, nous avons évalué les activités de protéases de types cystéine et aspartate dans des feuilles agroinfiltrées de la plante hôte *Nicotiana benthamiana*, en fonction de leur stade de développement. Nous démontrons que l'expression de l'inhibiteur *SICYS8* de tomate, actif contre les protéases de type cystéine, permet d'augmenter d'environ 40% le rendement en anticorps monoclonal C5-1, notre protéine modèle, dans les feuilles jeunes et matures où les activités protéolytiques sont moindres. Ces résultats prometteurs sur le plan appliqué font ressortir, en revanche, la complexité des processus biochimiques en cause et la pertinence de développer des stratégies complémentaires pour augmenter les teneurs en protéine recombinante. Dans cette optique, une nouvelle approche basée sur une diversion dirigée du métabolisme de défense de la plante hôte a été explorée. Nous démontrons qu'une activation du sentier de l'acide jasmonique induit dans les feuilles la production de protéines de stress, incluant des inhibiteurs de protéases de classes fonctionnelles variées; et une diminution de la teneur en RuBisCO, un contaminant majeur pendant la purification des protéines recombinantes. Sur cette base, nous avons adjoint à notre procédure de transfection un prétraitement des plantes au jasmonate de méthyle, une forme volatile de l'acide jasmonique. Ce prétraitement a permis d'une part de réduire considérablement les teneurs en RuBisCO dans les feuilles, et de doubler d'autre part le taux d'expression et le rendement en anticorps C5-1. Nos données appuient l'utilité éventuelle d'une manipulation du métabolisme de défense sur les rendements en protéine recombinante, complémentaire aux approches basées sur la co-expression d'inhibiteurs de protéases recombinants.



## Abstract

Plant molecular farming is an affordable and safe alternative to conventional expression animal and microbial systems for the production of clinically-useful recombinant proteins. However, these proteins are often susceptible to degradation by endogenous proteases of the host plant cells. Several strategies have been described to counter degradation processes including the co-expression of companion protease inhibitors. Few data, however, were available describing how the host plant's physiology, especially its developmental stage, could impact the expression and protection of a clinically useful heterologous protein. In this study, we assessed changes in the activity of cysteine and aspartate proteases in the widely adopted expression host *Nicotiana benthamiana*, as a function of leaf age. We demonstrate that the expression of a tomato cysteine protease inhibitor, *SICYS8*, allows to increase by nearly 40% the total yield of a model protein, the blood-typing C5-1 monoclonal antibody, in young and mature leaves where proteolytic activities are lower. Our results, while promising in practice, highlighted on the other hand the complexity of biochemical processes involved and the relevance of developing additional strategies to boost recombinant protein accumulation *in planta*. Towards this end, a new approach based on a deliberate diversion of the host plant defense metabolism was explored. We show that an activation of the jasmonic acid pathway in leaves induces the production of stress-related proteins, including protease inhibitors of various functional classes; and a significant decrease in the content of RuBisCO, a major contaminant during the purification of recombinant proteins. Based on this we included in our transfection procedure a pretreatment of plants with methyl jasmonate, a volatile form of jasmonic acid. This pretreatment significantly reduced RuBisCO levels in leaves, concomitant with a more than twofold increase of C5-1 yield in mature leaves. Our data highlight, overall, the potential of manipulating the host plant's defense metabolism to increase heterologous protein yields, in complement to current protein protection strategies involving the co-expression of recombinant protease inhibitors.



# Avant-propos

Ce projet de doctorat a été réalisé sous la direction du Professeur Dominique Michaud et la codirection du Dr. Frank Sainsbury, dans le cadre d'un projet de recherche réalisé en collaboration avec un partenaire industriel de longue date, l'entreprise de biotechnologie végétale Medicago inc. J'ai réalisé l'essentiel des travaux de laboratoire décrits dans la thèse, rédigé la première version des manuscrits et conçu l'ensemble des tableaux et figures. Mon directeur de thèse, Dominique Michaud, a été le principal concepteur du projet; il a aussi grandement contribué à l'interprétation des résultats et à la révision des manuscrits, tout comme mon codirecteur, Frank Sainsbury. L'ensemble des co-auteurs ont contribué à l'interprétation des résultats et à la correction des manuscrits avant soumission pour publication.

Les expériences et résultats inclus dans la thèse sont présentés en bonne partie sous la forme d'articles scientifiques rédigés en anglais et destinés à la publication dans des périodiques avec comité de lecture. Le document est composé de quatre chapitres. Le **Chapitre 1** est une revue de la littérature scientifique sur les avantages et les limites de la moléculaire végétale. Les stratégies développées pour la protection des protéines recombinantes dans les plantes y sont aussi abordées, de même que l'impact éventuel du système de défense de la plante hôte sur le rendement en protéine. Le **Chapitre 2**, très succinct, présente les hypothèses de recherche du projet et les objectifs réalisés pour les vérifier. Les résultats de mes travaux sont ensuite présentés et inclus pour l'essentiel dans deux manuscrits scientifiques qui forment le corps de la thèse. Le **Chapitre 3 (Article 1, publié dans *PLoS One*)** est intitulé: *Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of Nicotiana benthamiana*; y sont présentés les résultats du projet relatifs à l'expression transitoire et la protection d'un anticorps recombinant d'intérêt clinique, l'anticorps monoclonal C5-1, en fonction du stade de développement des organes foliaires de la plante hôte. Le **Chapitre 4 (Article 2, publié récemment dans *Plant Biotechnology Journal*)** est intitulé: *Leaf proteome rebalancing in Nicotiana benthamiana for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein*; sont présentés dans cet article les résultats du projet relatifs à l'activation du système de défense associé à l'acide jasmonique et aux effets de cette hormone sur la teneur en RuBisCO dans les feuilles, le rendement en protéine recombinante et la réponse de la plante à l'infection bactérienne à l'échelle moléculaire. Le **Chapitre 5**, enfin, est une brève discussion générale sur l'ensemble du projet, où les hypothèses de recherche formulées au départ sont reconsidérées une à une. Ce chapitre se termine par une conclusion générale où sont avancées quelques pistes de recherche pour la suite des choses.





# Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Dominique Michaud, pour avoir cru en moi et m'avoir donné la chance d'entreprendre des études doctorales au sein de son équipe. À vrai dire, je ne le remercierai jamais assez pour cela. Je dois aussi remercier mon co-directeur, Frank Sainsbury, pour son aide, ses corrections et tous ses bons conseils, dont le fameux « Trust but verify », que je n'oublierai jamais. Je n'aurais sûrement pas réussi cette thèse sans toute la confiance qu'ils ont mise en moi... Merci de m'avoir endurée et supportée!!!!

Je remercie aussi notre partenaire pour ce projet, la compagnie Medicago Inc., en particulier le Dr. Marc-André D'Aoust et M. Pierre-Olivier Lavoie, pour leur intérêt, leur aide technique et les réunions productives en cours de projet.

Je remercie par ailleurs la « Dynastie des Goulet », comme je les appelle, Marie-Claire, Catherine et Charles, pour leur aide technique précieuse, les « conversations statistiques » et les innombrables dîners animés. Un merci particulier aussi à Charles pour m'avoir permis de travailler à ses côtés en tant qu'auxiliaire d'enseignement.

Merci à ceux qui ont joint l'équipe en même temps que moi: Moustafa Khalf, Asieh Rasoolizadeh, Ann-Julie Rhéaume. Un grand merci aussi à Aurélie Munger et à ceux qui sont arrivés après moi: Philippe Varenne-Jutras, Marielle Gagné. Je n'oublie pas, bien sûr, Hélène Matte pour son soutien et sa gentillesse. Sans vous tous, la vie au labo n'aurait pas été la même!

Un merci aussi aux stagiaires qui sont passés au laboratoire: Maxime (qui m'a appris sans trop rigoler comment prononcer certaines expressions québécoises), Élisabeth, Jonathan, Théo et surtout mon ami César et sa famille pour tout ce qu'ils ont fait pour moi au labo et hors du labo.

Je ne vous ai pas oubliés à l'INAF: Émilie Desfossés-Foucault, Patricia Savard, Denis Roy, Dominique Gagné, Johanne Marin et tous les autres, pour ces années d'entraide inter-labos. Je remercie aussi Carole Martinez, Élise Savoie, Isabelle Clermont (et Jessica) à l'Environnement, et tous les étudiants et collègues que j'aurai pu oublier.

Je remercie Monsieur Pierre-Mathieu Charest pour son aide, sa confiance et pour m'avoir permis de travailler avec ces personnes formidables que sont Marie-Claude Julien, Olivier Soucy, Gilles Ayotte et Mélodie Paquet, sans oublier Denise Auclair et Russell Tweddell.

Finalement, le dernier mais non le moindre: merci à mon mari, Stéphane, pour son soutien et son amour malgré toutes ces soirées, ces nuits et ces fins de semaine à travailler, à parfois désespérer mais à ne jamais céder.

Stéphanie

*À Stéphane et Zachary,*



# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Avant-propos .....	vii
Remerciements .....	ix
Table des matières .....	xiii
Liste des tableaux .....	xvii
Liste des figures .....	xix
Liste des abréviations .....	xxi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 .....	3
Revue de littérature .....	3
1.1 La production de protéines recombinantes.....	5
1.1.1 Systèmes de production classiques .....	5
1.1.1.1. Les bactéries .....	5
1.1.1.2 Les levures.....	6
1.1.1.3 Les cellules animales.....	6
1.1.1.4 Les œufs .....	7
1.1.2 La moléculture végétale: une alternative efficace pour la production de protéines recombinantes.....	7
1.1.2.1 Transfection des cellules végétales .....	8
1.1.2.2. Transformation stable, expression transitoire .....	9
1.2 La protéolyse, souvent un frein à l'obtention de rendements satisfaisants en moléculture végétale.....	11
1.2.1 Instabilité des protéines recombinantes <i>in planta</i> .....	11
1.2.2 Sénescence et protéolyse.....	12
1.3 Stratégies pour la protection des protéines recombinantes en moléculture végétale .....	13
1.3.1 Stabilisation des protéines recombinantes <i>ex planta</i> .....	13
1.3.2 Stabilisation des protéines recombinantes <i>in planta</i> .....	14

1.3.2.1	Des lignées végétales déficientes en protéases .....	14
1.3.2.2	L'expression du transgène dans un tissu ou un organe pauvre en protéases.....	15
1.3.2.3	L'adressage intracellulaire des protéines recombinantes .....	16
1.3.2.4	La co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons .....	17
1.3.3	<i>Downstream processing</i> , rendement et qualité des produits protéiques recombinants..	19
1.3.3.1	La RuBisCO, un contaminant majeur des produits recombinants .....	19
1.3.3.1	Interactions jasmonate–salicylate <i>in planta</i> .....	20
Chapitre 2 .....		25
Hypothèses et objectifs de recherche .....		25
2.1.	Les hypothèses du projet de recherche.....	28
2.2	Les objectifs du projet de recherche.....	29
2.2.1	Objectifs relatifs à l'âge des feuilles .....	29
	EN RÉFÉRENCE À L'HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 1 .....	29
2.2.2	Objectifs relatifs au métabolisme de défense .....	30
	EN RÉFÉRENCE À L'HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 2.....	30
Chapitre 3 .....		33
Protection d'anticorps de mammifères recombinants contre la protéolyse dépendante du développement dans les feuilles du <i>Nicotiana benthamiana</i> .....		33
<i>(Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of Nicotiana benthamiana)</i> .....		33
3.1	Brève mise en contexte .....	35
3.2	Résumé .....	36
3.3	Abstract .....	37
3.4	Introduction .....	38
3.5	Materials and Methods .....	39
3.5.1	Expression constructs and agroinfiltration.....	39
3.5.2	Whole-leaf and leaf apoplast proteins .....	41
3.5.3	Protease assays .....	41
3.5.4	Immunodetections .....	42
3.5.5	C5-1 quantification.....	42
3.5.6	C5-1 activity .....	43

3.5.7	Statistical analyses.....	43
3.6	Results.....	44
3.6.1	Endogenous proteolytic activities are influenced by leaf age and agroinfiltration.....	45
3.6.2	The antibody-stabilizing effect of co-expressed protease inhibitors is leaf age-dependent.....	47
3.6.3	<i>S/CYS8</i> -stabilized C5-1 is biologically active.....	50
3.6.4	Co-expressed <i>S/CYS8</i> extends the accumulation phase of C5-1 in leaves.....	52
3.7	Discussion.....	53
3.8	Acknowledgments.....	56
3.9	Supporting information.....	56
Chapitre 4.....		59
Diversion du protéome foliaire chez <i>Nicotiana benthamiana</i> pour l'enrichissement pré-extraction d'une protéine recombinante exprimée transitoirement.....		59
<i>(Leaf proteome rebalancing in Nicotiana benthamiana for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein)</i> .....		59
4.1	Mise en contexte.....	61
4.1.1	Quelques résultats complémentaires.....	61
4.1.1.1	L'effet protecteur de <i>S/CYS8</i> sur l'anticorps C5-1 est lié à son activité anti-protéasique et à sa présence dans le système de sécrétion cellulaire.....	61
4.1.2	En conclusion.....	65
4.2	Résumé.....	67
4.3	Abstract.....	68
4.4	Introduction.....	69
4.5	Experimental procedures.....	70
4.5.1	Plant tissue sampling and elicitor treatments.....	70
4.5.2	Gene constructs and leaf agroinfiltration.....	71
4.5.3	Protein extraction, SDS-PAGE and immunoblotting.....	71
4.5.4	Mass Spectrometry.....	72
4.5.5	Protein identification.....	73
4.5.6	Real-time RT PCR.....	73
4.5.7	Bacterial counts.....	74

4.5.8	Protease assays .....	74
4.5.9	C5-1 quantification.....	75
4.5.10	Statistical analyses.....	75
4.6	Results and discussion.....	75
4.6.1	MeJA induces a leaf proteome rebalancing in <i>N. benthamiana</i> .....	75
4.6.2	MeJA has little effect on the <i>N. benthamiana</i> – <i>A. tumefaciens</i> interaction .....	79
4.6.3	MeJA also has little effect on protease activities in transfected leaves .....	80
4.6.4	MeJA treatment increases the accumulation of a transiently expressed recombinant protein 83 .....	84
4.7	Conclusions .....	85
4.8	Acknowledgements .....	86
4.9	Supporting information .....	86
Chapitre 5 .....		95
Conclusions et perspectives .....		95
5.1.	Retour sur les hypothèses.....	97
5.1.1	Hypothèse principale 1, sur l'influence du stade de développement des feuilles sur le rendement en anticorps C5-1.....	98
5.1.2	Hypothèse principale 2, sur l'influence des sentiers de défense de la plante hôte sur le rendement en anticorps C5-1.....	99
5.2.	En conclusion .....	101
Références .....		103
Annexe .....		125
Chapitre de livre.....		125



# Liste des tableaux

## Chapitre 3

**Table 3.1** C5-1 yield ( $\mu\text{g}$ ) per leaf and per plant in *N. benthamiana* plants transiently expressing C5-1 alone or C5-1 with *S/Cys8* or *S/CDI*..... 48

**Table S3.1** Proteolytic activities (units/sec) in whole leaf and apoplastic extracts of *N. benthamiana* leaves six days after infiltration with Agrobacteria containing an empty vector, or with Agrobacteria containing a C5-1 expression vector or uninfiltrated..... 57

## Chapitre 4

**Table 4.1** Stress-related proteins up-regulated in *N. benthamiana* leaves 7 days post-MeJA treatment..... 78

**Table S4.1** Complement to Table 1: Matched unique peptides for stress-regulated proteins up-regulated in *N. benthamiana* leaves 7 d post-MeJA treatment ..... 88

**Table S4.2** Forward and reverse oligonucleotide primers used for real-time RT PCR assays..... 93



# Liste des figures

## Chapitre 1

**Figure 1.1** Représentation schématique d'un plasmide Ti (A), d'un vecteur binaire typique (B) et d'un plasmide « helper » (C) utilisés pour la transformation. Tiré de Pacurar *et al.*, 2011..... 10

**Figure 1.2** Stabilisation des chaînes légère et lourde de l'anticorps recombinant C5-1 dans les feuilles agroinfiltrées de *Nicotiana benthamiana* exprimant transitoirement SICDI ou SICYS9..... 18

**Figure 1.3** Relation croisée entre les sentiers métaboliques impliqués dans la résistance systémique induite chez les plantes, le sentier dépendant de l'acide salicylique (SA) et le sentier dépendant de l'acide jasmonique (JA)..... 21

## Chapitre 3

**Figure 3.1** Binary vectors for C5-1, SICYS8 and SICDI expression..... 40

**Figure 3.2** Characterisation of *N. benthamiana* leaf biomass..... 44

**Figure 3.3** Major proteolytic activities in *N. benthamiana* leaves ..... 46

**Figure 3.4** Effect of co-expressed SICYS8 or SICDI on C5-1 accumulation..... 49

**Figure 3.5** Biological activity of C5-1 expressed alone or along with SICYS8 or SICDI..... 51

**Figure 3.6** Time-course accumulation of biologically active C5-1 expressed alone or along with SICYS8..... 53

**Figure S3.1** Activity levels of C5-1 along the leaf age gradient..... 58

## Chapitre 4

- Figure 4.1** Total soluble proteins (TSP), 1-D proteome profile and RuBisCO subunit levels in agroinfiltrated and control *N. benthamiana* leaves treated with the stress elicitor methyl jasmonate (MeJA) 24 h before infection..... 77
- Figure 4.2** Effect of MeJA treatment on PR-2 accumulation, agrobacteria numbers and/or transcription of the two *A. tumefaciens* virulence proteins VirB1 and VirE1 in *N. benthamiana* leaves..... 80
- Figure 4.3** Major protease activities in crude protein extracts of control and agroinfected *N. benthamiana* leaves treated with 0, 0.5, 1 or 2 mM MeJA 24 h before infiltration..... 82
- Figure 4.4** C5-1 recombinant antibody yield and expression in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves treated with 0, 0.5, 1 and/or 2 mM MeJA..... 84
- Figure S4.1** Niveaux d'accumulation d'anticorps C5-1 co-exprimé avec l'inhibiteur compagnon S/CYS8 ciblé dans différents compartiments cellulaires..... 63
- Figure S4.2** Accumulation de l'anticorps C5-1 exprimé seul ou avec S/CYS8 et S/CDI ciblés dans différents compartiments cellulaires dans les feuilles du *N. benthamiana*..... 65
- Figure S4.3** Immunodetection of *N. benthamiana* 33-kDa PR-2 protein in crude protein extracts of control and agroinfected leaves treated with 0, 0.5 or 1 mM MeJA, or with 1 mM arachidonic acid (AA), 24 h before (upper panel) or after (lower panel) agroinfiltration..... 87

## Liste des abréviations

AACT	$\alpha_1$ -antichymotrypsine humaine
ADN; DNA	Acide désoxyribonucléique; <i>desoxyribonucleic acid</i>
ADNc ; cDNA	ADN complémentaire ; <i>complementary DNA</i>
ADN-T; T-DNA	ADN de transfert; <i>transfer DNA</i>
ADP	Adénosine diphosphate
ANOVA	Analyse de variance ; <i>analysis of variance</i>
ARN ; RNA	Acide ribonucléique ; <i>ribonucleic acid</i>
ARNm ; mRNA	ARN messenger ; <i>messenger RNA</i>
BTH	Benzothiadiazole
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EV	<i>Mock infiltration with an empty vector</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
HC	<i>Heavy chain</i> (chaîne lourde)
HCl	<i>Hydrogen chloride</i> (chlorure d'hydrogène)
Ig	Immunoglobuline
JA	<i>Jasmonic acid</i> (acide jasmonique)
LC	<i>Light chain</i> (chaîne légère)
MeJA	<i>Methyl jasmonate</i> (jasmonate de méthyle)
MES	<i>2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid</i>
NaCl	<i>Sodium chloride</i> (chlorure de sodium)
nos	Nopaline synthase
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérase en chaîne)
PDI	<i>Protein disulphide isomerase</i>
PR	<i>Pathogenesis-related</i> (protein) (protéine reliée à la pathogénèse)
RuBisCO	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i>
RE; ER	Réticulum endoplasmique; <i>endoplasmic reticulum</i>
RSA	Résistance systémique acquise

RIS	Résistance induite systémique
SA	<i>Salicylic acid</i> (acide salicylique)
ScFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
SD	<i>Standard deviation</i> (écart-type)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	<i>Standard error</i> (erreur standard)
SICDI	Inhibiteur de cathepsine D de tomate; <i>Solanum lycopersicum</i> cathepsin D inhibitor
SICYS8	Huitième sous-unité de la multicystatine de tomate; <i>Solanum lycopersicum</i> multicystatin eighth subunit
SICYS9	Cystatine de tomate no. 9; <i>Solanum lycopersicum</i> Cystatin 9
SP	<i>Signal peptide</i> (peptide signal)
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>

# Introduction générale

Parmi les systèmes d'expression hétérologue considérés pour la production de protéines thérapeutiques recombinantes, les plantes se sont avérées, ces dernières années, une alternative intéressante aux systèmes courants comme les cellules animales, les levures ou *Escherichia coli* (Davies, 2010; Paul and Ma, 2011). Les végétaux offrent des avantages incontestables en moléculaire, tels la possibilité de produire des protéines complexes, des coûts de production avantageux, des produits sécuritaires et une échelle de production rapidement adaptable aux besoins (Gomord *et al.*, 2005; Streatfield, 2007; Karg and Kallio, 2009; Obembe *et al.*, 2011; Paul and Ma, 2011). Des protéines recombinantes produites par les plantes pour utilisation dans un cadre industriel, pour la recherche ou à des fins thérapeutiques sont aujourd'hui sur le marché, incluant notamment l'avidine, la  $\beta$ -glucuronidase, la trypsine (commercialisée par la société Sigma-Aldrich), des anticorps de type IgG et la taliglucérase alpha (Protalix Bio Therapeutics) approuvée en 2012 par la FDA américaine (Jamal *et al.*, 2009; Maxmen, 2012; Xu *et al.*, 2012).

Pour que le développement d'un système de production de produits protéiques soit efficace, il est nécessaire d'optimiser la qualité, le niveau d'expression et le rendement des protéines recombinantes d'intérêt. Plusieurs facteurs influencent l'expression de ces protéines, à savoir en particulier les taux de transcription et de traduction de leur séquence codante, les modifications post-traductionnelles qu'elles subissent en cours de maturation et leur lieu de stockage dans la cellule. Le choix d'un hôte pour l'expression dépend souvent des modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité et à l'intégrité de la protéine d'intérêt. Depuis une quinzaine d'années, des progrès importants ont été réalisés pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la production de protéines recombinantes chez les plantes, aussi bien au niveau de l'optimisation de la transcription du transgène et de la traduction des transcrits générés (Potenza *et al.*, 2004; Streatfield, 2007) qu'au niveau de l'élucidation et de la modulation des modifications post-traductionnelles caractéristiques de la machinerie cellulaire végétale (Gomord and Faye, 2004; Faye *et al.*, 2005). Plusieurs protéines thérapeutiques nécessitent un ou des clivages protéolytiques et une glycosylation complexe pour leur bioactivité, leurs propriétés pharmacocinétiques, leur stabilité ou leur solubilité. Il est bien connu, en pratique, qu'un patron de glycosylation inadéquat ou l'action non spécifique des protéases endogènes causent souvent des problèmes de rendement en système de production hétérologue végétal (Benchabane *et al.*, 2008).

Les enzymes protéolytiques, communément appelées protéases, assurent des fonctions métaboliques vitales chez les végétaux. Elles contribuent au contrôle global des voies métaboliques,

enzymatiques et de transduction en dirigeant l'activation ou l'hydrolyse des protéines impliquées dans des processus régulateurs clés, dirigeant par exemple la mort cellulaire programmée ou l'élimination des protéines mal repliées. Les protéases assurent aussi le recyclage des acides aminés lors de la sénescence ou leur mobilisation pendant la germination (Vierstra, 1996; Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008). En moléculaire, ces enzymes représentent en revanche un obstacle à surmonter pour la production efficace de protéines recombinantes. Chez les plantes, comme chez tous les autres systèmes d'expression hétérologue, les rendements obtenus en fin de course ne dépendent pas seulement d'un niveau d'expression efficace du transgène mais aussi de la stabilité de la protéine résultante (Faye *et al.*, 2005). Les protéases endogènes, retrouvées notamment au niveau du système sécrétoire des cellules de la plante, peuvent altérer de façon dramatique la stabilité ou l'intégrité des protéines étrangères exprimées, que ce soit *in vivo* pendant la phase d'expression ou *ex planta* lors de la phase de récupération (Goulet et Michaud, 2006; Rivard *et al.*, 2006; Benchabane *et al.*, 2008; Pillay *et al.*, 2014).

Les protéases endogènes ne sont pas seules à influencer la synthèse et la qualité des protéines recombinantes, la procédure utilisée pour leur expression pouvant par exemple avoir un impact important. La production de protéines recombinantes dans les plantes est réalisée, souvent, par l'emploi du vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens*, qui a la capacité d'intégrer une partie de son ADN dans les cellules végétales et de permettre ainsi l'expression d'un transgène d'intérêt (Gelvin, 2003). Dans ce cas, le processus d'expression hétérologue est lié *de facto* au système de défense de la plante réagissant aux bactéries utilisées, qui implique le sentier de l'acide salicylique et l'expression parallèle de composés de défense pouvant en théorie altérer l'accumulation du produit recombinant (Veena *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008; Goulet *et al.*, 2012). Dans ce contexte, le présent projet avait pour but, dans un premier temps, d'établir plus clairement l'impact des protéases endogènes de la plante sur le rendement en protéines recombinantes et le potentiel des inhibiteurs de protéases recombinants pour la protection de ces protéines. Il avait pour but, dans un deuxième temps, d'explorer le potentiel d'une « manipulation délibérée » du système de défense de la plante hôte pour l'obtention de rendements accrus en protéines recombinantes.



# **Chapitre 1**

## **Revue de littérature**



Afin de bien situer le présent projet de thèse, ce chapitre présente une brève revue de littérature sur ce qu'est la moléculaire, définie dans son sens large comme la production d'une protéine recombinante dans un hôte d'expression portant l'information génétique nécessaire à sa biosynthèse. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi la feuille comme hôte modèle pour cette production. Le projet a porté notamment sur le problème de dégradation des protéines produites et sur les stratégies envisagées jusqu'ici pour contourner ce problème. Il nous apparaissait pertinent, en parallèle, d'explorer les liens existant entre la protéolyse et différents phénomènes physiologiques dans la plante hôte, liés en particulier au développement des feuilles et à la mise en place des réactions de défense en réponse à l'infection.

## **1.1 La production de protéines recombinantes**

### **1.1.1 Systèmes de production classiques**

#### **1.1.1.1. Les bactéries**

Les premières protéines recombinantes destinées à des fins cliniques ont été produites dans des cellules bactériennes, notamment *Escherichia coli*. Ces organismes simples présentent l'avantage d'avoir été très étudiés et leur physiologie cellulaire très bien documentée. *E. coli* a permis, entre autres, la production efficace de protéines humaines comme l'hormone de croissance, l'insuline recombinante et l'interféron  $\beta$ . D'autres bactéries ont été utilisées comme hôtes d'expression, comme le *Lactococcus lacti* ou différentes espèces du genre *Pseudomonas* (Chen, 2012). La transformation des cellules bactériennes est réalisée en général par le biais de vecteurs plasmidiques portant un gène pour la protéine d'intérêt, communément appelé transgène. Ce transgène et un marqueur de sélection flanqués de deux régions homologues sont intégrés dans le génome bactérien par recombinaison (Richter and Gescher, 2012), après quoi les transformants sont sélectionnés grâce au marqueur de sélection.

En dépit de leurs nombreux avantages, les bactéries sont des organismes procaryotes et ne réalisent pas la plupart des modifications post-traductionnelles nécessaires au repliement adéquat et à la maturation de nombreuses protéines d'intérêt clinique. En particulier, les bactéries n'opèrent pas la glycosylation des protéines, un processus important pour la stabilité et l'activité biologique d'une majorité de protéines d'intérêt clinique. De plus, la production de protéines dans les cellules procaryotes n'est pas exempte de difficultés techniques, telles la solubilité limitée et la purification parfois difficile des produits recombinants (Berlec *et al.*, 2013). Les protéines recombinantes exprimées fortement dans les bactéries forment souvent des corps d'inclusion dans le cytoplasme, qui rendent difficile leur extraction et compromettent leur intégrité structurale et leur activité biologique. Souvent pour ces raisons, des systèmes de production alternatifs ont été mis au point au fil des années.

### 1.1.1.2 Les levures

Par exemple, des microorganismes eucaryotes cultivés en bioréacteurs ont été utilisés sur une base courante, incluant les levures *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces organismes unicellulaires sont parmi les eucaryotes les plus simples; ils présentent l'avantage d'opérer l'essentiel des modifications post-traductionnelles nécessaires à la stabilité et à l'activité des protéines recombinantes, à l'exception du processus de carboxylation. La production d'une protéine étrangère dans les levures consiste d'abord à cloner la séquence codante de la protéine dans une cassette d'expression contenant le promoteur d'un gène de levure et une séquence de terminaison. Deux méthodes sont ensuite disponibles pour la transformation des levures, à savoir l'électroporation et une intégration chimique à l'acétate de lithium. Ces deux méthodes permettent l'entrée de l'ADN recombinant dans les cellules et leur insertion dans le génome récepteur. La sélection des transformants est faite sur des milieux de sélection à marqueurs auxotrophiques (par exemple *URA3*, *LEU2* ou *TRP1*) ou de résistance aux antibiotiques (Porro *et al.*, 2005).

La production de protéines recombinantes dans les levures présente des avantages mais aussi de nombreux désavantages. Les coûts de production nets sont souvent élevés et il est difficile d'atteindre une densité cellulaire satisfaisante en bioréacteurs. La stabilité génétique des lignées recombinantes produites est de surcroît problématique, entraînant souvent des délais dans les calendriers de production. Les risques de contamination sont également importants (Goncalves *et al.*, 2013) et la glycosylation des protéines recombinantes produites est parfois incorrecte ou incomplète.

### 1.1.1.3 Les cellules animales

Les systèmes animaux les plus courants pour la production de protéines recombinantes sont les cellules de mammifères, utilisées actuellement comme hôtes pour la majorité des produits recombinants thérapeutiques approuvés par la FDA américaine (Datta *et al.*, 2013). Les cellules animales ont permis jusqu'ici la production d'une gamme variée de protéines, incluant des anticorps monoclonaux, des hormones, des cytokines et des produits sanguins. Les cellules le plus utilisées sont les cellules ovariennes de hamster (CHO), les cellules de myélomes murins, les cellules de fibroblastes murins et les cellules embryonnaires de rein humain. Des cellules d'insectes ont aussi été adoptées par plusieurs; des lignées de cellules de lépidoptères ont par exemple servi non seulement à l'étude de la physiologie des insectes et à la production de baculovirus pour le contrôle biologique des insectes herbivores, mais aussi à la production de particules virales et de protéines thérapeutiques, en raison de leur transformation aisée à l'aide de baculovirus (Ikonomou *et al.*, 2003, Drugmand *et al.*, 2012). Bien que les systèmes d'expression utilisant des cellules animales permettent une glycosylation effective des protéines recombinantes, ils

montrent aussi plusieurs désavantages, comme un temps et un coût de production élevés, ou encore un risque de contamination par des agents infectieux nocifs pour l'humain.

#### **1.1.1.4 Les œufs**

D'autres systèmes animaux pour l'expression de protéines recombinantes reposent sur l'utilisation d'œufs de poule, notamment pour la production de vaccins contre le virus de la grippe. Une souche du virus de l'influenza est ciblée tous les deux ans par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et une version recombinante de cette souche est utilisée pour infecter des œufs, qui développent alors des anticorps spécifiques à la souche ciblée. Il faut en moyenne un à deux œufs pour produire une dose de vaccin, pour une période d'incubation pouvant durer jusqu'à douze jours avant extraction et purification des particules virales. Le principal inconvénient de cette approche de production est la durée du procédé: six mois sont requis, en général, entre le début de la production et l'injection d'un vaccin fonctionnel chez l'humain. Il convient de noter aussi que l'utilisation d'œufs fertiles pourrait conduire à une pénurie d'œufs pour consommation humaine et, qui plus est, à des risques accrus de propagation éventuelle de la grippe aviaire (Penney *et al.* 2011).

### **1.1.2 La moléculature végétale: une alternative efficace pour la production de protéines recombinantes**

En raison d'une demande grandissante du marché pour des protéines thérapeutiques variées, les systèmes de production actuels pourraient rapidement atteindre la saturation et des approches alternatives doivent être développées. La production de protéines recombinantes dans les plantes présente à cet effet des avantages certains par rapport aux systèmes de production classiques. Les coûts de production sont moindres; la glycosylation, bien que présentant des différences mineures comparé au système animal, est opérée de manière efficace dans les cellules végétales; la production peut être faite à grande échelle et rapidement adaptée aux besoins grâce une biomasse importante et des systèmes de culture souvent bien maîtrisés (Paul et Ma 2011). À ce jour, plusieurs protéines d'intérêt médical ont été produites dans les plantes, incluant des anticorps, des vaccins, des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des facteurs de coagulation, des cytokines, des hormones et des antigènes (Hiatt *et al.*, 1989; Ma *et al.*, 1995, 2003, 2005a; Kirk et Webb, 2005; Twyman *et al.*, 2005; Floss *et al.*, 2007; Lienard *et al.*, 2007; Daniell *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009; Rybicki *et al.*, 2009; D'Aoust *et al.*, 2010).

### 1.1.2.1 Transfection des cellules végétales

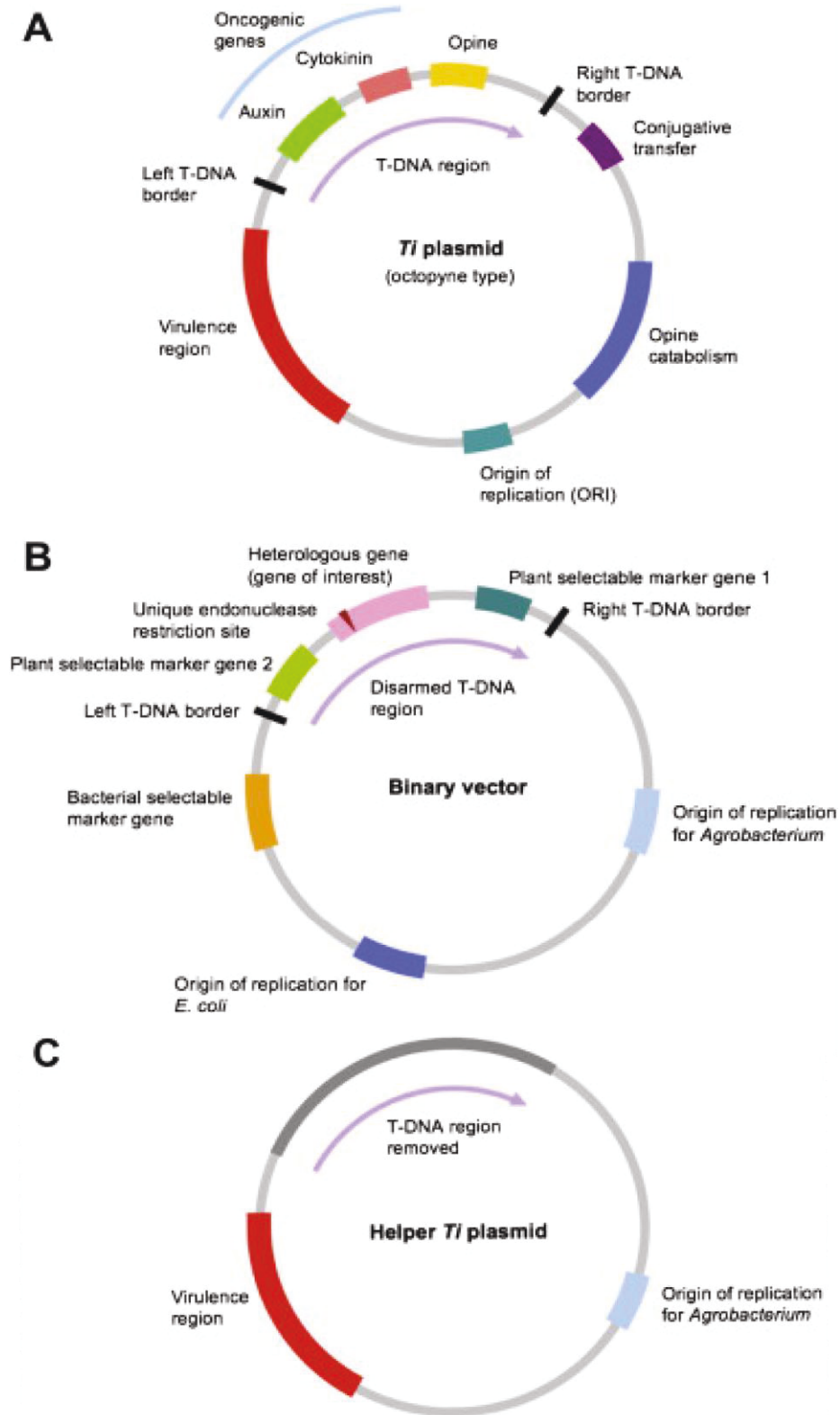
La moléculaire végétale consiste à produire des protéines recombinantes dans des cellules végétales, des tissus ou des plantes entières, une approche rendue possible le plus souvent par l'utilisation du vecteur de transfert bactérien *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie responsable de la galle du collet se distingue par sa capacité à transférer à la plante une partie de son ADN, l'ADN-T retrouvé dans le plasmide *Ti* (tumor-inducing), qui se dirige ultimement vers le noyau de la cellule végétale pour être intégré dans l'ADN hôte (Gelvin, 2003). Dans la nature, cette bactérie manipule la plante pour la synthèse d'analogues fonctionnels des cytokinines, des opines, dont l'action induit un appel de composés carbonés et azotés essentiels à son bon développement dans les cellules infectées. Les agrobactéries reconnaissent des molécules-signal, notamment des composés phénoliques et des sucres, émises par les tissus végétaux blessés. Leur action post-infection induit la formation de tumeurs chez la plante par une modification des cellules cambiales, cellules précurseurs des éléments de tube criblés du phloème et des éléments de vaisseaux du xylème, dans les tissus touchés. Pour être utilisées pour la production de protéines recombinantes, des souches de cette bactérie dites « désarmées » ont été modifiées de manière à pouvoir toujours infecter la plante hôte mais à ne pas causer les symptômes de la maladie. Des sections du plasmide *Ti* ont été supprimées, en particulier les gènes responsables de la synthèse d'opines et de la formation de tumeur, et remplacées par des sites de clonage nucléotidiques pour l'intégration des transgènes d'intérêt et des séquences régulatrices nécessaires à leur expression. Ce plasmide modifié porte le nom de vecteur binaire, complémentaire à un plasmide « helper » inclus dans la souche, qui porte les gènes de virulence *vir* nécessaires au processus d'infection (Pacurar *et al.*, 2011) (**Figure 1.1**).

Au laboratoire, les agrobactéries transformées sont sélectionnées à l'aide de gènes de résistance à différents antibiotiques, puis transférées aux cellules foliaires par diverses approches, comme par exemple par infiltration (ou agroinfiltration) sous-vide (Leuzinger *et al.*, 2013) ou à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille (D'Aoust *et al.*, 2009). L'entrée du matériel génétique bactérien dans les cellules foliaires est un processus complexe impliquant des protéines encodées par des gènes situés dans la région de virulence du plasmide *Ti* (**Figure 1.1C**). Après adhésion de la bactérie aux cellules saines et sensibles de la plante, il y a activation des gènes de virulence *vir* et des endonucléases, VirD1/VirD2, ciblent les séquences bordant l'ADN-T. Ces nucléases coupent le brin complémentaire non transcrit de l'ADN-T du plasmide *Ti*, qui se présente alors sous une forme simple brin, le brin-T. La protéine VirD2 s'attache ensuite de façon covalente à l'extrémité 5' du brin-T, et le conjugué protéine/ADN est alors transféré dans la cellule-cible via la paroi cellulaire, par l'intermédiaire d'un système de sécrétion composé de protéines VirB et VirD4. D'autres protéines nécessaires au processus de transformation, VirE2, VirE3, VirF et VirD5, sont exportées par la bactérie. Bien que le mode de fonctionnement du processus soit très

complexe, il est généralement admis que le brin-T est assemblé dans la cellule végétale et entouré par des protéines VirD2 et VirE2, qui possèdent des signaux de localisation nucléaire et agissent comme protéines pilotes pour la migration de l'ADN-T en direction du noyau cellulaire (Lacroix *et al.*, 2006; Pacurar *et al.*, 2011).

### **1.1.2.2. Transformation stable, expression transitoire**

Deux approches sont utilisées pour l'expression de protéines recombinantes dans les plantes à l'aide d'*A. tumefaciens*: la transformation stable et l'expression transitoire post-transfection. La transformation stable implique la production de lignées végétales transgéniques, dont l'ensemble des cellules portent le transgène intégré. En pratique, le développement et la sélection d'une lignée transgénique utile en moléculaire peut prendre plusieurs mois, voire plus d'un an. De surcroît, la production à fort rendement n'est souvent pas possible et parfois instable, en raison de la nature aléatoire du lieu d'insertion génique et des phénomènes de « *gene silencing* » (ou de répression génique) établis dans la plante avec le temps, qui induisent la dégradation des ARN messagers encodés par le transgène (Rybicki, 2008).



**Figure 1.1** Représentation schématique d'un plasmide *Ti* (A), d'un vecteur binaire type (B) et d'un plasmide « *helper* » (C) utilisés pour la transformation génétique des végétaux. Tiré de Pacurar *et al.*, 2011.



L'expression transitoire, qui repose aussi sur l'intégration des constituants d'un vecteur binaire dans la cellule végétale, est utilisée à diverses fins, notamment dans le développement de cassettes d'expression. Dans ce cas, le transgène ne s'intègre pas nécessairement dans le génome de la plante et aucune étape de transformation stable n'est requise. Ces dernières années, l'expression transitoire est devenue une méthode de choix pour la production, en quelques jours, de quantités considérables de protéines recombinantes d'intérêt. Différents systèmes d'expression transitoire ont permis la production de milligrammes de protéines à partir d'une ou de quelques plantes seulement (Huang et al., 2009; Lindbo, 2007; Marillonnet et al., 2004; Sainsbury and Lomonosoff, 2008; Vezina et al., 2009). Des progrès récents du génie génétique, tels le développement de nouveaux promoteurs ou l'utilisation de vecteurs viraux, en ont fait une méthode de choix pour la production de protéines recombinantes à grande échelle (De Muynck *et al.*, 2010). Des systèmes automatisés pour l'agroinfiltration des plantes ont été mis au point basés sur l'utilisation de systèmes sous vide, qui permettent de traiter plusieurs plantes à la fois (Leuzinger *et al.*, 2013).

## **1.2 La protéolyse, souvent un frein à l'obtention de rendements satisfaisants en moléculaire végétale**

### **1.2.1 Instabilité des protéines recombinantes *in planta***

La moléculaire végétale, malgré ses avantages, n'est pas exempte de difficultés. Par exemple, certaines protéines recombinantes s'accumulent à des niveaux impressionnants chez les plantes mais d'autres subissent une dégradation rapide par protéolyse et montrent des rendements limités, sinon nuls. Plusieurs protéines étrangères sont attaquées rapidement par des protéases foliaires endogènes, avec comme résultat un faible rendement malgré des transcrits d'ARNm facilement détectables. La dégradation des protéines recombinantes dépend des sites de clivage accessibles aux protéases endogènes à leur surface (Badri *et al.*, 2009a; Benchabane *et al.*, 2009). Des accumulations très faibles, souvent inférieures à 0,01% des protéines solubles totales, ont été observées pour plusieurs protéines d'intérêt médical exprimées chez les plantes, incluant par exemple l'interféron  $\beta$ , l'érythropoïétine et le facteur de croissance épidermique humain (Daniell *et al.*, 2001). Des travaux ont été faits ces dernières années pour comprendre ces phénomènes de protéolyse et pour en baliser les effets, mais le problème demeure important dans plusieurs cas. Les phénomènes de protéolyse sont essentiels *in vivo*, notamment pour la maturation des protéines sécrétées. Ils permettent le retrait du peptide signal et des peptides régulateurs en cours de biosynthèse protéique. Ils permettent aussi à la plante de se défendre contre des agents pathogènes, ou encore de dégrader les protéines mal repliées ou endommagées qui circulent dans la cellule. Dans un

contexte de moléculaire, la protéolyse, bien qu'essentielle à la plante, représente souvent un frein à la production efficace de protéines recombinantes (Faye *et al.*, 2005).

À l'échelle d'une plante vasculaire, le métabolisme protéolytique est particulièrement complexe. Chez *A. thaliana*, environ 1,900 gènes codent pour des protéines impliquées directement ou indirectement dans l'hydrolyse de liens peptidiques, et plusieurs centaines de protéases ont été décrites à ce jour (Schaller 2004). Le système protéolytique le mieux caractérisé chez les plantes est le sentier ubiquitine/protéasome, dont les composantes sont encodées par environ 5% du génome codant de la plante, soit près de 1,300 gènes (Smalle et Vierstra, 2004). Le protéasome, qui joue de nombreux rôles dans la plante, serait surtout impliqué dans la régulation du développement et la croissance de la plante, en complément à différentes protéases plus ou moins spécifiques encodées par environ 600 gènes additionnels. Ces quelque 600 protéases sont impliquées, comme le protéasome, dans une variété de processus métaboliques et cellulaires. Sur le plan biochimique, ces enzymes sont catégorisées en fonction de leur mécanisme d'action et de leur spécificité pour certains substrats. Il existe, selon la classification usuelle, des exoprotéases, ou exopeptidases, qui clivent les chaînes polypeptidiques à leur extrémité N- ou C-terminale; et des endoprotéases, ou endopeptidases, qui clivent ces chaînes de l'intérieur. Plusieurs grandes familles d'endoprotéases ont été décrites à ce jour chez les plantes, incluant les protéases de type cystéine, les protéases de type sérine et les protéases de type aspartate, nommées en fonction des acides aminés requis pour leur activité catalytique.

### **1.2.2 Sénescence et protéolyse**

Des protéases diverses sont retrouvées dans tous les tissus d'une plante (Schaller, 2004) mais certains organes, comme les organes sénescents, en contiennent des quantités considérables. La sénescence des feuilles, en particulier, est un processus de détérioration tissulaire dirigée causant la mort des cellules, relié essentiellement à l'âge de l'organe mais influencé aussi par différents facteurs hormonaux et environnementaux. En pratique, ce processus ubiquiste aurait des effets négatifs sur la production de protéines recombinantes à l'échelle de la plante, bien que très peu de données soient toujours disponibles sur le sujet (Stevens *et al.*, 2000).

Lors du vieillissement d'une feuille, un changement majeur survenant dans la structure des cellules est la rupture des chloroplastes, qui contiennent jusqu'à 70% des protéines cellulaires. Un catabolisme accru des macromolécules permet alors une conversion des macromolécules accumulées en nutriments exportables pour le développement des organes en croissance. Des macromolécules comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont alors dégradées rapidement (Lim *et al.*, 2007). Dans le

cas des protéines, la dégradation est sélective ou non sélective. La voie sélective implique en général le sentier ubiquitine/protéasome, alors que la voie non sélective implique des protéases à large spectre d'action souvent libérés de la vacuole (Jing *et al.*, 2003). Les teneurs en protéines chutent de façon marquée dans les feuilles âgées, alors que les protéases de type cystéine, de type aspartate et de type sérine y montrent une augmentation de leur expression et de leur activité (Lin et Wu, 2004). Une étude menée sur des mutants d'*A. thaliana* a montré que des vacuoles d'un type particulier associées à la sénescence présentent une teneur importante en protéases de type cystéine (Otegui *et al.*, 2005). Ces connaissances sur la protéolyse en fonction du développement, bien que toujours fragmentaires, soulèvent la question des impacts de ce processus sur le rendement en protéines recombinantes à l'échelle de la plante hôte, qui serait, du moins en théorie, affecté par la prépondérance relative des protéases endogènes d'un tissu ou d'un organe à l'autre.

### **1.3 Stratégies pour la protection des protéines recombinantes en moléculaire végétale**

Plusieurs stratégies ont été mises au point ces dernières années pour éluder ou contrer la dégradation des protéines recombinantes chez les plantes. Ces stratégies visent, ultimement, à améliorer le rendement et la qualité des protéines recombinantes, aussi bien *ex planta* pendant l'extraction ou la purification des protéines, qu'*in planta* pendant leur biosynthèse et leur accumulation.

#### **1.3.1 Stabilisation des protéines recombinantes *ex planta***

Les protéines recombinantes peuvent être endommagées, voire complètement dégradées, au cours de leur extraction à partir des tissus végétaux, une opération qui mène *de facto* à des bris cellulaires et à la libération de l'ensemble des protéases cellulaires dans la solution d'extraction (Rivard *et al.*, 2006; Benchabane *et al.*, 2008). Plusieurs protéases sont accumulées dans la lumière vacuolaire des feuilles en croissance, dont une gamme d'endoprotéases et d'exoprotéases à large spectre d'action (Müntz *et al.*, 2007). Des stratégies ont été mises au point, depuis vingt ans, pour protéger les protéines recombinantes *ex planta*, au moment de leur récupération à partir des tissus végétaux (Rivard *et al.*, 2006; Benchabane *et al.*, 2008). La première étape de récupération des protéines recombinantes en moléculaire consiste en l'extraction des protéines. Cette étape a une influence marquée sur la stabilité et la qualité globales des protéines extraites, et par conséquent sur la nature et l'abondance des protéines disponibles pour l'analyse, l'enrichissement et la purification ultérieure du produit protéique recherché (Michaud et Asselin, 1995; Menkhaus *et al.*, 2004; Benchabane *et al.*, 2008).

De simples précautions techniques peuvent être prises durant l'extraction des protéines pour en protéger l'intégrité. Les plantes sont souvent considérées comme des sources récalcitrantes pour l'extraction des macromolécules, en raison de leur architecture particulière et de leur contenu riche en hydrolases et en composés oxydatifs (Saravanan et Rose, 2004; Carpentier *et al.*, 2005; Benchabane *et al.*, 2008). Les cellules de tissus végétaux métaboliquement actifs comme les feuilles présentent en général un faible contenu en protéines comparé aux cellules animales ou bactériennes, ainsi qu'un espace vacuolaire qui occupe la plus grande partie du volume cellulaire et qui contient des composés hautement réactifs potentiellement nuisibles à l'intégrité des protéines (Michaud et Asselin, 1995; Müntz *et al.*, 2007). Les plantes contiennent aussi plusieurs composés –comme des huiles, des composés phénoliques ou des pigments photosynthétiques– qui doivent être éliminés durant la purification d'une protéine d'intérêt. Après rupture des membranes cellulaires, une perte de protéines est généralement attendue alors qu'il y a libération d'agents dénaturants, en particulier des phénols et des protéases (Menkhaus *et al.*, 2004; Saravanan et Rose, 2004). Plusieurs approches ont été proposées au cours des années pour éviter la perte de protéines dans les extraits végétaux (Michaud et Asselin, 1995; Menkhaus *et al.*, 2004; Schillberg *et al.*, 2005, Benchabane *et al.*, 2008), qui consistent notamment à traiter les échantillons rapidement après récolte, à choisir un procédé d'extraction bien adapté au tissu considéré et à minimiser les phénomènes de dégradation en travaillant à des pH défavorables aux activités protéolytiques endogènes (Michaud et Asselin, 1995). Des inhibiteurs de protéases inorganiques actifs contre les différentes classes de protéases libérées dans les extraits peuvent être ajoutés dans le tampon d'extraction afin de stabiliser les protéines *in vitro* (Benchabane *et al.*, 2008). La co-expression d'inhibiteurs de protéases accessoires, ou « inhibiteurs compagnons », permet aussi de protéger les protéines recombinantes pendant l'extraction, par une inhibition des protéases libérées suite au bris des cellules (Rivard *et al.*, 2006).

### **1.3.2 Stabilisation des protéines recombinantes *in planta***

Plusieurs stratégies ont été proposées par ailleurs pour minimiser l'hydrolyse des protéines recombinantes *in planta*. Les sections qui suivent résument ces stratégies, développées dans l'ensemble pour la protection des protéines pendant leur phase d'accumulation dans la plante.

#### **1.3.2.1 Des lignées végétales déficientes en protéases**

En théorie, la stratégie la plus efficace pour éviter l'hydrolyse des protéines recombinantes serait d'utiliser des lignées végétales mutantes, déficientes en protéases actives contre les protéines d'intérêt. Des

souches d'*E. coli* (Jiang *et al.*, 2002; Rozkov and Enfors, 2004) et des levures (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino and Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005) déficientes en protéases reconnues comme étant problématiques ont été conçues il y a plusieurs années et sont utilisées aujourd'hui dans de nombreux laboratoires pour la production de protéines recombinantes. Malheureusement, cette approche est difficilement applicable aux plantes supérieures, qui sont des organismes multicellulaires de structure complexe et très différenciée. La protéolyse joue un rôle central dans le développement et la croissance de ces organismes, et les protéases sont de surcroît d'une grande diversité dans les cellules et tissus végétaux (Beers *et al.*, 2004). Une alternative éventuelle aux lignées mutantes serait de créer des lignées transgéniques montrant une activité protéolytique réduite, après avoir identifié les protéases endommageant les protéines recombinantes et mis au point des stratégies d'ARN antisens ou de « gene silencing » pour en réprimer la biosynthèse (Watson *et al.*, 2005). Cette approche pourrait s'avérer utile à court terme dans le cas des cultures de cellules végétales (Mandal *et al.*, 2014), mais aucune évidence empirique de son utilité n'a encore été rapportée avec une plante entière malgré l'identification de gènes cibles potentiels (Niemer *et al.*, 2014).

### **1.3.2.2 L'expression du transgène dans un tissu ou un organe pauvre en protéases**

Les protéases diffèrent d'un tissu à l'autre en termes de quantité et de qualité (Schaller, 2004), et le tissu (ou l'organe) sélectionné pour la production de protéines recombinantes a du même fait une influence marquée sur le rendement et la qualité du produit final (Benchabane *et al.*, 2008). À ce jour, la plupart des protéines recombinantes produites dans les plantes ont été obtenues à partir de gènes placés sous le contrôle de promoteurs constitutifs, tels le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S) ou le promoteur de l'ubiquitine 1 du maïs, qui dirigent une expression du transgène partout où il est présent (Potenza *et al.*, 2004). Des promoteurs spécifiques à certains tissus ou organes ont été isolés depuis et sont maintenant disponibles pour l'expression de transgènes dans des tissus ou des organes particuliers. Il a été suggéré que l'expression dite « ciblée » du transgène dans des tissus peu actifs sur le plan métabolique pose moins de risques pour la stabilité de la protéine exprimée en raison d'un contenu faible en protéases endogènes (Benchabane *et al.*, 2008). Le choix du tissu peut être également influencé par le type de protéine recombinante produite, comme par exemple un tissu comestible sélectionné pour la production d'un vaccin oral, ou un tissu excréteur pour une protéine sécrétée (Streatfield, 2007). Certains organes comme les graines ou les tubercules sont des lieux de réserve pour la plante et présentent un métabolisme moins actif en raison d'un éventuel état de dormance. De tels organes ont été décrits comme étant particulièrement appropriés pour l'accumulation de protéines recombinantes (Stoger *et al.*, 2005). Des protéines d'intérêt médical ont été accumulées avec succès, par exemple, dans la vacuole de cellules

de graines chez le maïs, le soja ou le blé, suite à leur expression sous le contrôle de promoteurs constitutifs ou spécifiques à ces tissus (Streatfield *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Drakakaki *et al.*, 2006).

### 1.3.2.3 L'adressage intracellulaire des protéines recombinantes

Comme pour les différents organes, les protéases diffèrent en quantité et en qualité d'un organe cellulaire à l'autre (Goulet *et al.*, 2006). Pour cette raison, le lieu d'accumulation de la protéine recombinante dans la cellule peut avoir un impact marqué sur les rendements et la qualité du produit (Benchabane *et al.*, 2008). En pratique, les protéines recombinantes peuvent être ciblées vers des compartiments cellulaires spécifiques par l'ajout de signaux d'adressage fusionnés aux transgènes dans les constructions génétiques. En l'absence d'un peptide signal, la protéine recombinante s'accumulera souvent dans le cytoplasme (Streatfield, 2007). Dans certaines études où la protéine d'intérêt a été ciblée dans différents compartiments cellulaires, des variations de rendement considérables ont été observées. Par exemple, les niveaux d'accumulation de chaînes d'anticorps recombinants ScFv anti-cutinase et ScFv anti-dihydroflavonol ont augmenté de vingt à cent fois lorsque les protéines étaient ciblées dans le réticulum endoplasmique plutôt que dans le cytosol (De Jaeger *et al.*, 1999).

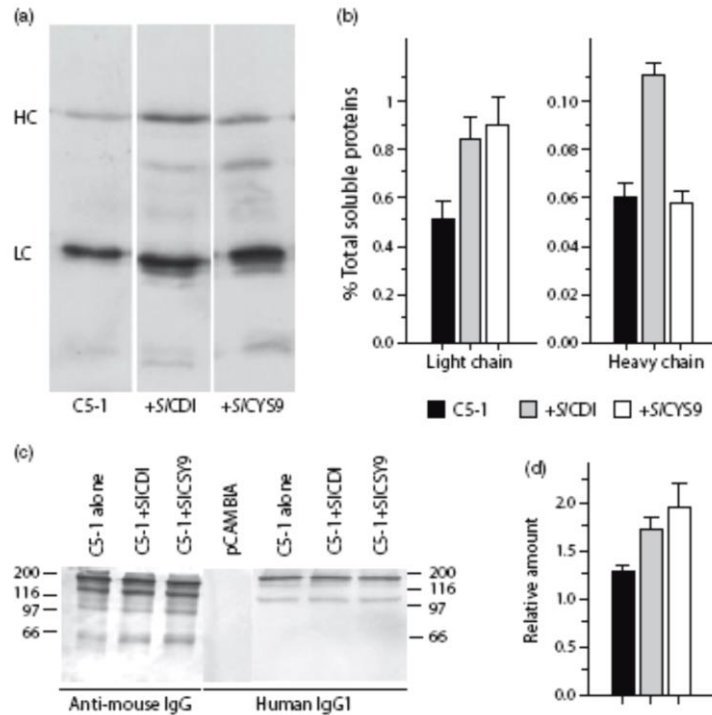
Les protéines recombinantes peuvent en outre interférer avec le métabolisme de la plante (Badri *et al.*, 2009). L'accumulation de l'hormone de croissance humaine dans le cytosol ou dans l'apoplaste a conduit, par exemple, à une nécrose des cellules végétales transfectées, alors qu'aucune nécrose n'était observée avec la protéine ciblée dans le chloroplaste (Gils *et al.*, 2005). Ces phénomènes d'interférence et de maturation protéique demeurent complexes et imprévisibles considérant l'état actuel de nos connaissances sur le sujet. En pratique, la façon la plus appropriée de choisir où cibler l'expression d'une protéine recombinante, pour un rendement maximal, est encore de tester différentes destinations en tenant compte, le cas échéant, des données disponibles sur les propriétés physicochimiques de la protéine recombinante et le microenvironnement de chaque organe cible.

Plusieurs compartiments cellulaires, comme le cytosol, le réticulum endoplasmique et d'autres compartiments du système de sécrétion cellulaire, sont considérés comme des destinations possibles (Daniell, 2006; Ma *et al.*, 2003; Goulet et Michaud, 2006, Benchabane *et al.*, 2008). Le choix du compartiment doit tenir compte aussi des modifications post-traductionnelles requises pour la protéine recombinante d'intérêt, utilisée ensuite dans un contexte thérapeutique spécifique. La majorité des protéines d'intérêt médical se caractérisent par des modifications post-traductionnelles qui influencent leurs propriétés pharmacocinétiques, leur bioactivité et leur utilité clinique. Ces modifications post-traductionnelles incluent des modifications covalentes qui produisent des dérivés de résidus d'acides aminés individuels (par exemple la glycosylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ADP-ribosylation),

des réactions protéolytiques qui dirigent un clivage spécifique de la chaîne peptidique exprimée, et différentes modifications non enzymatiques comme la déamidation et des changements spontanés de conformation de la protéine. Plusieurs modifications post-traductionnelles surviennent dans les compartiments cellulaires du système de sécrétion, à savoir le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Faye *et al.*, 2005). Or, la plupart des protéines ciblées comme étant d'intérêt pharmaceutique sont sujettes à la glycosylation, un processus qui se déroule dans ces deux compartiments cellulaires et qui limite souvent le choix des destinations possibles.

#### **1.3.2.4 La co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons**

Plusieurs études ont montré par ailleurs que la co-expression ectopique d'inhibiteurs de protéases dans les plantes peut avoir un effet significatif, parfois positif, sur le contenu en protéines dans les feuilles ou les racines (Benchabane *et al.*, 2008; Badri *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2010, 2012; Pillay *et al.*, 2014). Il a été rapporté il y a déjà plus de dix ans que l'expression ectopique d'un inhibiteur de protéase de type cystéine, l'oryzacystatine I, augmentait la teneur en protéines totales d'environ 20% dans des lignées de tabac accumulant cette protéine dans le cytoplasme (Van der Vyver *et al.*, 2003). Une première étude démontrant la protection d'une protéine recombinante par un inhibiteur de protéases exogène a été fournie par Komarnytsky *et al.* (2006), qui rapportaient que des anticorps recombinants sécrétés des racines de plants de tabac transgéniques étaient protégés lorsque co-exprimés [et co-sécrétés] avec un inhibiteur Bowman-Birk du soja. Notre groupe de recherche rapportait quelques années plus tard qu'un inhibiteur de protéases à large spectre d'action contre les protéases de types aspartate et sérine, l'inhibiteur de cathepsine D de tomate (*S/CDI*), exprimé dans des lignées transgéniques de pommes de terre augmentait les niveaux de protéines totales endogènes dans les feuilles et permettait de stabiliser une protéine thérapeutique hétérologue, l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine humaine (AACT), exprimée transitoirement dans le cytosol des cellules foliaires (Goulet *et al.*, 2010). Une autre étude de notre groupe décrivait, plus récemment, la protection d'un anticorps recombinant par deux inhibiteurs de protéases, *S/CDI* et la cystatine de tomate *S/CYS9*, exprimés transitoirement dans le système de sécrétion cellulaire des feuilles du *N. benthamiana* (**Figure 1.2; Goulet *et al.*, 2012**).



**Figure 1.2** Stabilisation des chaînes légère et lourde de l'anticorps recombinant C5-1 exprimé transitoirement dans des feuilles agroinfiltrées du *N. benthamiana* co-exprimant S/CDI ou S/CYS9. (a) Immunodétection des chaînes lourde (HC) et légère (LC) exprimées pendant 6 jours, isolément, avec S/CDI ou avec S/CYS9. (b) Taux relatifs des chaînes lourde et légère de l'anticorps C5-1, exprimés sur une base relative des protéines totales. (c) Immunodétection des fragments de l'anticorps C5-1 séparés en conditions non réductrices avec un anticorps de chèvre anti-souris ou des anticorps humains IgG1 conjugués à une peroxydase. (d) Taux relatifs en multimères d'anticorps C5-1 exprimés dans les feuilles. Chaque barre en (b) et (d) est la moyenne de six réplicats biologiques  $\pm$  SE. Tiré de Goulet *et al.*, 2012.

La confection de plantes transgéniques déficientes en activités protéasiques spécifiques pourrait fournir, en pratique, un milieu cellulaire clément adapté à l'expression et à l'accumulation de protéines fragiles sur le plan structural. De manière similaire, la co-expression d'inhibiteurs compagnons dans des systèmes de transfection pour l'expression transitoire de protéines d'intérêt permettrait l'obtention de rendements accrus en protéines labiles (Goulet *et al.*, 2012). Dans cette optique, un premier objectif du présent projet était de confirmer, à l'échelle de la plante, le potentiel des inhibiteurs de protéases compagnons pour l'expression d'une protéine modèle, l'anticorps diagnostique C5-1 (Vézina *et al.*, 2009), exprimée transitoirement dans les feuilles du tabac sauvage *N. benthamiana* (v. plus loin **Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de recherche**).



### **1.3.3 *Downstream processing*, rendement et qualité des produits protéiques recombinants**

Le rendement en protéine recombinante dépend en bout de course de la quantité de produit hautement purifié finalement disponible pour utilisation clinique, déterminée non seulement par les taux relatifs de biosynthèse et de dégradation de la protéine dans la plante, mais aussi par le ratio *protéine recombinante/protéines natives* au terme du processus d'expression. La teneur relative initiale en protéine recombinante dans les extraits bruts est un facteur important dans l'équation du rendement parce qu'elle influence directement l'efficacité des procédés de production post-extraction, liés notamment au taux de purification final effectif et au taux de contamination du produit par les protéines endogènes (Wilken and Nikolov, 2012).

#### **1.3.3.1 La RuBisCO, un contaminant majeur des produits recombinants**

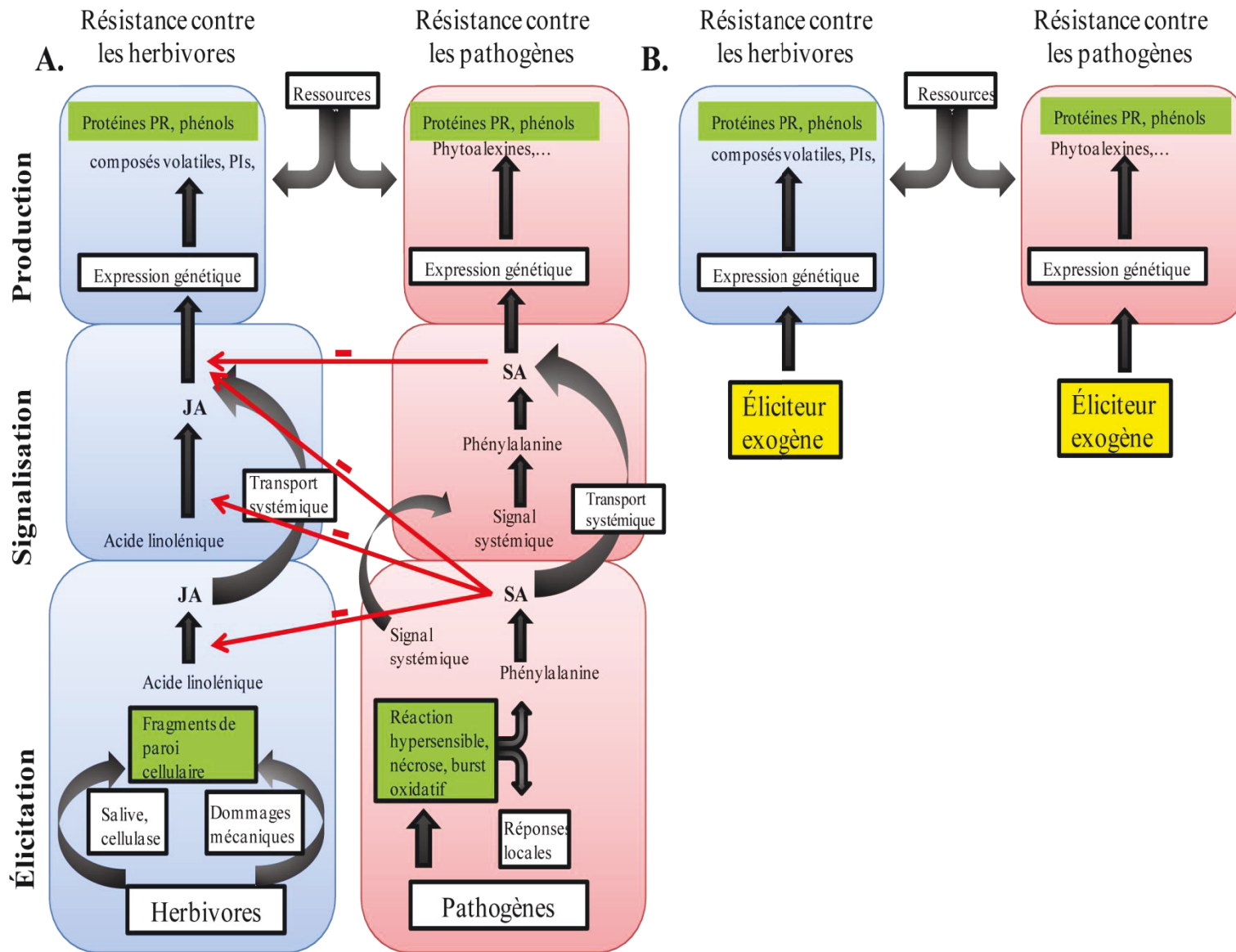
La ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) représente, à cet égard, un contaminant majeur des extraits protéiques foliaires et une contrainte significative au rendement final post-purification (Geada *et al.*, 2007). Cette enzyme est, de loin, la protéine foliaire la plus abondante, avec un taux relatif moyen avoisinant 50% des protéines totales chez les plantes de type C3 (Ellis, 1979). Sous sa forme native, la RuBisCO présente une structure quaternaire complexe formée de l'agencement co-translationnel de deux sous-unités constitutives, une 'petite sous-unité' de ~17 kDa encodée par le génome nucléaire et une 'grosse sous-unité' de ~50 kDa encodée par le génome chloroplastique (Makino *et al.*, 1984; Imai *et al.*, 2008). En théorie, une baisse de la teneur en RuBisCO dans les feuilles pourrait montrer un intérêt double pour le rendement d'une protéine recombinante en diminuant, d'une part, son potentiel contaminant en cours de purification; et en libérant, d'autre part, des ressources en acides aminés pour la biosynthèse protéique avant l'étape d'extraction. Il a été démontré, dans le cadre d'études effectuées sur des graines, que de réprimer l'expression de protéines endogènes sur-abondantes permet de hausser la teneur en protéine recombinante dans les tissus producteurs (Goossens *et al.*, 1999; Schmidt and Herman, 2008; Kim *et al.*, 2012). Les stratégies adoptées jusqu'ici pour induire une baisse de la teneur en protéines sur-abondantes ont impliqué pour la plupart une répression de la traduction des ARNm codants par l'entremise de transcrits *antisens* ou d'ARN interférants exprimés sous le contrôle du promoteur de la protéine ciblée.

Une répression de la biosynthèse de RuBisCO par une approche similaire, bien qu'attrayante à priori, est difficilement envisageable en pratique considérant les fonctions vitales de cette protéine dans la plante, la difficulté éventuelle de réprimer simultanément l'expression de deux sous-unités protéiques sur-abondantes, et le nombre élevé de copies du gène de la grosse sous-unité dans le génome chloroplastique.

En revanche, une activation délibérée du sentier de défense des octadécanoïdes –ou sentier du jasmonate– nous semblait d’un intérêt éventuel pour reproduire un effet résultant comparable à l’échelle cellulaire, dans la mesure où les réponses de la plante à l’agroinfection n’inhibent pas les effets souhaités. Plusieurs études ont documenté, depuis dix ans, l’effet répressif marqué du jasmonate sur l’expression des gènes impliqués dans la photosynthèse, notamment ceux des sous-unités nucléaire et chloroplastique de la RuBisCO (Hermsmeier *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2008; Bilgin *et al.*, 2010; Duceppe *et al.*, 2012; Ullmann-Zeunert *et al.*, 2013). Très peu de données ont été rapportées, toutefois, sur les interactions antagonistes établies dans la plante entre les sentiers du jasmonate et du salicylate (Thaler *et al.*, 2012) dans un contexte de moléculture utilisant le vecteur bactérien *A. tumefaciens*.

### 1.3.3.1 Interactions jasmonate–salicylate *in planta*

En réponse à une attaque par un agent pathogène, la plante met en place plusieurs stratégies de défense, incluant une réponse « immunitaire » de résistance se déroulant en trois grandes étapes, à savoir: (i) une élicitation de la réponse de défense par l’agent pathogène, initiée par une reconnaissance de composantes structurales de cet organisme par des récepteurs membranaires spécifiques; (ii) un processus de signalisation intracellulaire menant à l’activation ou la répression de gènes ‘répondant au sentier’; et (iii) la production de molécules de défense pour contrer l’agent nuisible (**Figure 1.3A**). Cette réponse au site d’infection conduit dans plusieurs cas à l’induction d’une réponse systémique via la production de composés vecteurs d’information et leur migration en direction des autres tissus et organes de la plante. À l’échelle moléculaire, la plante peut répondre directement à des éliciteurs chimiques liés aux sentiers en cause, notamment des hormones de signalisation comme l’acide jasmonique, l’éthylène et l’acide salicylique. Comme l’éliciteur pathogénique, ces composés peuvent induire la production des composés de défense variés menant à une réponse de défense systémique dans la plante (**Figure 1.3B**).



**Figure 1.3** Relation croisée entre les sentiers métaboliques impliqués dans la résistance systémique induite chez les plantes, le sentier dépendant de l'acide salicylique (SA) et le sentier des octadécanoïdes dépendant de l'acide jasmonique (JA). A : Aperçu global des interactions entre les sentiers de défense dépendants du salicylate et du jasmonate. Les éliciteurs et facteurs communs aux deux sentiers apparaissent dans les encadrés verts. B : Élicitation des réactions de défense par des facteurs externes. (PIs : inhibiteurs de protéases). Figure adaptée de Heil et Bostock, 2002.

La résistance induite conduit dans plusieurs cas à un état de résistance systémique acquise (RSA) dépendant de l'acide salicylique (SA); elle peut mener aussi à une résistance induite systémique (RIS) impliquant le sentier des octadécanoïdes dépendant du jasmonate ou de l'éthylène (Derksen *et al.*, 2013). Alors que la RSA est souvent associée à la défense contre des agents pathogènes biotrophes tels plusieurs champignons, bactéries et virus, la RIS est surtout associée à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes, les arthropodes herbivores phytophages causant des blessures mécaniques, ou des stress abiotiques comme la sécheresse ou le froid (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). La RIS a été surtout décrite dans des études d'interactions entre les plantes et les insectes herbivores. Une fois activé le sentier du jasmonate, la plante produit une variété de molécules de défense, incluant notamment des inhibiteurs de protéases pour l'inhibition des protéases digestives des insectes herbivores. Chez les Solanacées, des inhibiteurs de protéases induits par les blessures ont été identifiés pour l'inhibition des grandes familles d'endoprotéases de types sérine, cystéine et aspartate, toutes activées par le sentier du jasmonate (Ryan, 2000).

En moléculaire, toute approche de transfection génique utilisant la bactérie *A. tumefaciens* est liée *de facto* à la mise en place de réactions de défense impliquant le sentier du salicylate (Goulet *et al.*, 2012). S'il est bien connu que ce sentier et, présumément, la RSA sont activés fortement lors d'une agroinfiltration (Goulet *et al.*, 2010), très peu de données sont disponibles en revanche quant aux effets de cette induction sur l'expression protéique, quant à sa régulation dans la plante utilisée comme bio-usine à protéines, et quant à son renversement éventuel dans la plante soumise à différentes conditions externes. Des études ont démontré que l'acide salicylique atténue les effets de l'agrobactérie en réprimant sa virulence (Yuan *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008), ce qui pourrait en théorie altérer à la baisse le processus de transfection et l'expression des transgènes introduits. L'activation du sentier du salicylate entraîne en outre une forte production de molécules de défense, notamment les protéines reliées à la pathogénèse, ou protéines PR (Spoel *et al.*, 2003, Derksen *et al.*,

2013), qui pourraient affecter indirectement la disponibilité en acides aminés disponibles pour la biosynthèse des protéines hétérologues.

Comme les sentiers du salicylate et du jasmonate montrent en général des effets antagonistes dans la plante (Derksen *et al.*, 2013), il nous apparaissait tentant de spéculer qu'une activation délibérée du sentier des octadécanoïdes puisse éventuellement s'avérer utile en pratique aussi bien pour « tempérer » l'impact négatif de la RSA contre la bactérie porteuse du transgène que pour augmenter la disponibilité en ressources aminées pour la biosynthèse protéique par une répression partielle de la production de protéines de défense et, tel que discuté précédemment, un effet de répression sur la teneur en RuBisCO. En pratique, plusieurs composés peuvent être utilisés pour induire les sentiers du salicylate et du jasmonate de façon exogène, incluant des analogues fonctionnels du salicylate comme l'acide isonicotinique ou le benzothiadiazole (BTH); ou le jasmonate de méthyle (MeJA), un dérivé volatil de l'acide jasmonique, comme activateur du sentier des octadécanoïdes. À notre connaissance, aucune étude évaluant l'impact d'un effet antagoniste délibéré du jasmonate sur le sentier de l'acide salicylique dans un contexte de moléculture n'avait encore été publiée jusqu'ici. *Sur cette base [et en complément au premier objectif relatif aux inhibiteurs de protéases compagnons], un second objectif clé du présent projet était de documenter l'effet « anti-RuBisCO » éventuel du MeJA dans les feuilles du N. benthamiana, puis d'évaluer l'impact possible éventuel d'une altération conséquente du protéome foliaire sur la teneur en protéine modèle C5-1 exprimée transitoirement dans les tissus traités (v. ci-après, **Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de recherche**).*



## **Chapitre 2**

### **Hypothèses et objectifs de recherche**





La revue bibliographique du chapitre précédent soulignait l'intérêt d'utiliser des plantes pour la production de protéines recombinantes et mettait en évidence la pertinence de comprendre plus à fond les mécanismes complexes sous-jacents à une telle production. Plusieurs protéines recombinantes ont été produites avec succès dans les plantes mais peu de données sont toujours disponibles à ce jour sur les liens possibles entre la production effective de protéines recombinantes et la physiologie de la plante hôte, aussi bien au niveau de son développement qu'en lien avec la mise en place de son système de défense. Le présent projet doctoral s'est attardé à ces questions, avec comme hôte d'expression le tabac sauvage *N. benthamiana*. Cette plante a été utilisée comme modèle pour de nombreuses études sur les interactions plantes-pathogènes en raison de ses attributs avantageux sur le plan expérimental, comme sa biomasse importante et sa grande facilité de manipulation, la possibilité de la cultiver sur de grandes superficies, et son absence dans la chaîne alimentaire humaine (Goodin *et al.*, 2008). *N. benthamiana* est également utilisée de plus en plus pour la production de protéines recombinantes, notamment par notre partenaire industriel pour ce projet, la compagnie Medicago inc. La production de protéines recombinantes chez cette plante et d'autres espèces du même genre botanique peut se faire selon des stratégies d'expression stable ou transitoire, et plusieurs transgènes peuvent être exprimés en simultané (Goulet *et al.*, 2010). Dans le cadre de ce projet, les essais d'expression ont été faits suivant une procédure d'agroinfiltration développée spécifiquement pour la production de protéines recombinantes dans les feuilles du *N. benthamiana* (Kapila *et al.*, 1997; D'Aoust *et al.*, 2009). Selon cette approche, les feuilles de la plante hôte sont agroinfiltrées sous pression à l'aide d'une seringue, ou sous vide par l'application d'un vacuum. Les feuilles infiltrées sont récoltées après six jours, au cours desquels les transgènes se seront exprimés. Cette stratégie d'expression, très efficace et n'impliquant pas la production *a priori* de lignées transgéniques, permet aussi d'éviter les effets toxiques éventuels des protéines recombinantes exprimées sur le métabolisme de la plante en croissance.

L'objectif pratique du présent projet était d'optimiser la production d'une protéine recombinante d'intérêt dans les feuilles du *N. benthamiana* en la protégeant de la dégradation protéolytique à l'aide d'inhibiteurs de protéases compagnons ou en opérant une diversion délibérée du métabolisme de défense de l'hôte végétal en direction du sentier du jasmonate. La protéine d'intérêt choisie pour l'étude, l'anticorps monoclonal diagnostique C5-1, présente une forte affinité pour les immunoglobulines G (IgG) humaines et s'avère utile en pratique pour le phénotypage des groupes sanguins. Les anticorps monoclonaux sont d'un intérêt majeur sur le plan clinique, à des fins diagnostiques ou pour le traitement de maladies chroniques ou infectieuses (Vézina *et al.*, 2009). L'anticorps C5-1 a été utilisé à plusieurs reprises comme modèle pour l'étude de la production d'IgG chez les plantes. Son profil de dégradation protéolytique dans les cellules a été caractérisé en détail

(Khoudi *et al.*, 1999; Sainsbury *et al.*, 2008; Vézina *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2012), ce qui s'avérait d'intérêt dans le présent projet pour étudier l'effet protecteur des inhibiteurs de protéases compagnons contre la protéolyse.

## 2.1. Les hypothèses du projet de recherche

Deux hypothèses de recherche principales –et six hypothèses secondaires, ou sous-hypothèses– ont été testées dans le cadre du projet, à savoir :

- **HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 1, SUR L'INFLUENCE DU DÉVELOPPEMENT FOLIAIRE ET L'EFFICACITÉ DES INHIBITEURS DE PROTÉASES COMPANONS**

« Le stade de développement des feuilles du *N. benthamiana* a une influence déterminante sur la production de protéines recombinantes dans la plante considérée dans son entièreté. »

- **Sous-hypothèse 1.1 :** La teneur en anticorps recombinant C5-1 chez *N. benthamiana* diminue avec l'âge physiologique des feuilles.
- **Sous-hypothèse 1.2 :** L'effet de protection éventuel d'un inhibiteur de protéases compagnon sur l'anticorps C5-1 dépend du stade physiologique de la feuille considérée.
- **Sous-hypothèse 1.3 :** Le taux d'expression, l'activité biologique et le ciblage intracellulaire d'un inhibiteur de protéases compagnon influencent le rendement en anticorps C5-1 dans les feuilles du *N. benthamiana*.

- **HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 2, SUR L'INFLUENCE DU MÉTABOLISME DE DÉFENSE**

« Le rendement en protéine recombinante dans les feuilles du *N. benthamiana* est favorisé par une activation exogène du métabolisme de défense lié à l'acide jasmonique. »

- **Sous-hypothèse 2.1 :** Un ajustement du protéome foliaire du *N. benthamiana* traité au jasmonate de méthyle (MeJA) favorise l'expression de l'anticorps C5-1 exprimé transitoirement dans les feuilles.

- **Sous-hypothèse 2.2** : Une diminution de la teneur en RuBisCO dans les feuilles traitées au MeJA réduit la teneur relative initiale en protéines résiduelles et augmente la teneur spécifique en anticorps C5-1 dans la plante.
- **Sous-hypothèse 2.3** : Une teneur accrue en inhibiteurs de protéases endogènes dans les feuilles traitées au MeJA diminue la « charge protéolytique » du tissu et favorise les rendements en anticorps C5-1.

## 2.2 Les objectifs du projet de recherche

### 2.2.1 Objectifs relatifs à l'âge des feuilles

#### EN RÉFÉRENCE À L'HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 1

Trois objectifs spécifiques (**Objectifs i, ii et iii**) ont été poursuivis afin de tester la première hypothèse principale du projet, relative à l'impact de l'âge des feuilles sur le taux de production de protéine recombinante et l'efficacité des inhibiteurs de protéases compagnons. Le but de ces objectifs était, en somme, d'établir un lien éventuel entre l'âge des feuilles productrices, le rendement en anticorps C5-1 et l'efficacité de protection de cette protéine en présence d'inhibiteurs de protéases compagnons :

- i) Caractériser des paramètres de biomasse foliaire du *N. benthamiana* utilisé pour la production de protéines, comme données de base pour une représentation schématique de l'âge physiologique de la plante en cours de développement.

Le poids des feuilles, leur densité pondérale et leur contenu en protéines solubles ont été caractérisés afin d'établir des liens éventuels entre l'âge des feuilles sur la plante hôte et le rendement en anticorps C5-1.

- ii) Caractériser le contenu en protéases foliaires totales et apoplastiques dans des plants de *N. benthamiana* exprimant ou non l'anticorps C5-1.

L'apoplaste, correspondant ici aux espaces intercellulaires entre les cellules foliaires, est le lieu d'accumulation de plusieurs protéines recombinantes d'intérêt clinique. Comme l'agroinfection induit une réponse de défense chez la plante hôte menant à l'expression éventuelle de protéases et

d'inhibiteurs de protéases, l'activité des protéases de types cystéine (*cathepsin L-like*) et aspartate (*cathepsin D/E-like*) a été étudiée afin de lier ces activités à l'impact possible du développement foliaire sur la production d'anticorps C5-1.

- iii) Caractériser l'effet protecteur d'inhibiteurs de protéases compagnons de classes fonctionnelles distinctes sur la protection de l'anticorps C5-1, en fonction du stade de développement des feuilles de la plante hôte.

Notre groupe de recherche a rapporté antérieurement que deux inhibiteurs de protéases à large spectre, l'inhibiteur de type aspartate/sérine *SICDI* et l'inhibiteur de type cystéine *SICYS9*, permettaient d'augmenter les rendements en anticorps C5-1 dans les feuilles du *N. benthamiana* parvenues à maturité (Goulet *et al.*, 2012). Afin de valider ces données et pour lier les effets observés à la plante prise dans son entièreté, nous avons effectué une étude systémique de l'effet de protection des inhibiteurs compagnons en fonction de l'âge des feuilles. Nous avons choisi comme inhibiteurs modèles l'inhibiteur *SICDI* et l'inhibiteur *SICYS8*, ce dernier inhibiteur correspond à la huitième sous-unité de la multicystatine de tomate (Goulet *et al.*, 2008). Le premier inhibiteur inactive plusieurs protéases de types sérine et aspartate; le second inactive les protéases de type cystéine, avec une efficacité en général plus forte que l'inhibiteur *SICYS9* (Girard *et al.*, 2007).

## 2.2.2 Objectifs relatifs au métabolisme de défense

### EN RÉFÉRENCE À L'HYPOTHÈSE PRINCIPALE NO. 2

La deuxième hypothèse principale du projet, relative au métabolisme de défense de la plante hôte, a été testée par des objectifs de recherche impliquant l'application exogène de MeJA. Les impacts attendus du MeJA incluaient une baisse de la teneur RuBisCO; une expression accrue de protéines de défense diverses, incluant des inhibiteurs de protéases; et une baisse éventuelle de la teneur en protéines PR après agroinfiltration étant donné l'effet antagoniste du jasmonate sur le sentier du salicylate. Les quatre objectifs spécifiques suivants ont été poursuivis (**Objectifs iv, v, vi et vii**) :

- iv) Caractériser les effets du MeJA sur le protéome foliaire du *N. benthamiana* et en quantifier l'impact sur la teneur en RuBisCO.

Étant donné que les effets du MeJA à l'échelle du protéome n'ont pas encore été étudiés formellement chez *N. benthamiana*, il apparaissait pertinent d'établir si les effets observés chez d'autres plantes seraient aussi observés chez cette espèce. Des analyses d'images sur patrons électrophorétiques 1-D ont été réalisées à partir d'échantillons foliaires récoltés de feuilles traitées ou non au MeJA. Les principales formes protéiques montrant une teneur altérée en présence de MeJA ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse de type *shotgun*.

- v) Caractériser les effets du MeJA sur l'activation du sentier de l'acide salicylique dans la plante, sur la croissance des agrobactéries utilisées pour la transfection et sur l'expression des gènes de virulence de ces mêmes bactéries suite à l'infiltration.

L'accumulation de protéines PR-2 –des  $\beta$ -glucanases– dans les feuilles agroinfiltrées du *N. benthamiana* (Goulet *et al.*, 2010) a été étudiée afin de mesurer l'effet du MeJA sur la réponse de la plante à l'infection bactérienne. Les protéines PR-2 sont exprimées fortement et sécrétées en grande quantité dans l'apoplaste en réponse à l'agroinfiltration, via la mise en place du sentier de l'acide salicylique (Goulet *et al.*, 2012). Il apparaissait pertinent ici de vérifier si le MeJA pouvait montrer un effet répressur sur l'accumulation de ces protéines. Comme l'activation du sentier du salicylate nuit à la bactérie et à sa virulence (Yuan *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008), il apparaissait pertinent également d'évaluer l'impact du MeJA sur la croissance bactérienne et l'expression post-infection de ses gènes de virulence. L'idée était d'établir si les effets positifs ou négatifs du MeJA éventuellement observés sur le rendement en C5-1 étaient liés ou non, en totalité ou en partie, à des effets sur la survie ou l'efficacité de transfection du vecteur bactérien.

- vi) Évaluer l'effet du MeJA sur l'activité des protéases foliaires endogènes.

Afin de mieux comprendre les effets du MeJA sur l'accumulation de l'anticorps C5-1, il apparaissait utile d'en évaluer aussi l'impact sur les principales activités protéasiques de l'environnement foliaire. Notre groupe de recherche a démontré qu'une baisse de l'activité des protéases endogènes, notamment des protéases de type aspartate, entraînait une hausse du rendement en anticorps C5-1 chez *N. benthamiana* (Goulet *et al.*, 2012). Des activités protéolytiques endogènes de types sérine, cystéine et aspartate ont été mesurées ici dans les feuilles de la plante hôte, afin de dresser un portrait sommaire de la « charge protéolytique » dans les feuilles, avec ou sans traitement au MeJA.

- vii) Évaluer le rendement en C5-1 et les taux de transcrits d'ARNm pour les chaînes légère et lourde de cet anticorps après traitement des plantes avec différentes doses de MeJA.

Une étude antérieure effectuée dans notre laboratoire avait démontré un impact significatif d'une dose de MeJA de 400  $\mu\text{M}$  sur l'identité des protéines dans les feuilles de la pomme de terre (Rivard *et al.*, 2004). Nous avons, dans la présente étude, testé des doses croissantes de MeJA variant de 0 à 2,000  $\mu\text{M}$  afin d'évaluer si une réponse présumée de la plante à l'échelle du protéome était dépendante de la dose utilisée. Nous avons aussi évalué l'effet des différentes doses de MeJA sur l'accumulation en anticorps C5-1 et le taux de transcription de ses chaînes lourde et légère dans une feuille adulte parvenue à maturité.

## Chapitre 3

### **Protection d'anticorps de mammifères recombinants contre la protéolyse dépendante du développement dans les feuilles du *Nicotiana benthamiana***

*(Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*)*

Les résultats de ce chapitre ont été publiés en 2013 dans le périodique scientifique *PLoS One*<sup>1</sup>. Les auteurs de l'article étaient Stéphanie Robert, Moustafa Khalf, Marie-Claire Goulet, Marc-André D'Aoust, Frank Sainsbury et Dominique Michaud.

---

<sup>1</sup> Robert S, Khalf M, Goulet M-C, D'Aoust M-A, Sainsbury F, Michaud D (2013) Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 8 (7), e70203.





### 3.1 Brève mise en contexte

La revue de littérature du Chapitre 1 rappelait que la production de protéines recombinantes chez les végétaux n'est pas exempte de défis, notamment à cause des phénomènes de protéolyse souvent observés au niveau des protéines recombinantes produites. Une étude de Goulet *et al.* (2010) traitant de l'impact des agrobactéries sur le protéome apoplastique foliaire du *N. benthamiana* suggérait que le processus d'agroinfiltration pouvait montrer des effets autant sur la physiologie de la plante que sur son métabolisme de défense, avec un impact éventuel possible aussi bien sur les processus de protéolyse *in planta* et l'expression des protéines recombinantes que sur l'efficacité éventuelle d'inhibiteurs de protéases compagnons co-exprimés pour les protéger. Il est bien établi que les activités protéolytiques varient d'un compartiment cellulaire à l'autre ou d'un stade physiologique à l'autre, notamment durant la sénescence. Aucune donnée n'avait toutefois abordé directement, jusqu'ici, l'impact de l'agroinfiltration et de l'expression d'une protéine recombinante sur ces activités protéolytiques en fonction du développement de la plante.

Le but du présent article, en lien direct avec la première hypothèse principale du projet (**Hypothèse 1**), était de comprendre comment les activités protéolytiques évoluaient avec l'âge des feuilles et comment ce même paramètre de développement influençait l'expression d'une protéine recombinante d'intérêt et l'effet de protection d'inhibiteurs de protéases compagnons exprimés conjointement pour la protéger. Les activités protéolytiques prédominantes normalement retrouvées dans les feuilles, de types cystéine et aspartate, ont été étudiées ici en fonction de l'âge des feuilles, de même que l'effet d'inhibiteurs de protéases compagnons dirigés contre ces enzymes sur l'abondance de l'anticorps modèle C5-1. Tel que spécifié précédemment, deux inhibiteurs ont été testés, à savoir la cystatine de tomate *S/CYS8* et l'inhibiteur de tomate à large spectre *S/CDI*.

## 3.2 Résumé

La production de protéines d'intérêt médical dans les plantes s'est accélérée ces dernières années avec le développement de systèmes d'expression transitoire à hauts rendements basés sur l'infiltration agrobactérienne. Il apparaît maintenant nécessaire de mieux connaître comment le développement et le métabolisme de la plante hôte influencent la quantité et la qualité des protéines recombinantes exprimées. La protéolyse endogène est un déterminant clé de la stabilité et du rendement des protéines recombinantes dans les plantes. Nous avons caractérisé ici les profils des protéases de type cystéine (C1A) et aspartate (A1) dans les feuilles d'une plante hôte largement utilisée en moléculaire, *Nicotiana benthamiana*, en relation avec la production d'un anticorps murin, l'anticorps C5-1, ciblé dans le système de sécrétion cellulaire. Le processus d'agroinfiltration a altéré de façon significative la distribution des protéases C1A et A1 dans la plante, permettant d'établir une corrélation entre l'âge des feuilles et le niveau de protéolyse dans des extraits protéiques totaux et apoplastiques. Une co-expression de la cystatine de tomate *S/CYS8*, un inhibiteur des protéases C1A, en parallèle à l'anticorps C5-1 a permis d'augmenter le rendement en anticorps d'environ 40% après six jours d'incubation, pour un rendement total de ~3 mg d'anticorps par plante. Aucun effet positif de *S/CYS8* n'a été observé dans les feuilles plus âgées, dans lesquelles le niveau d'activité des protéases C1A augmentait parallèlement à une expression très faible de l'inhibiteur. Les rendements en C5-1 ont été augmentés en revanche d'un 40% additionnel dans les jeunes feuilles après une période d'incubation plus longue, de huit à dix jours, corrélée à une expression de l'inhibiteur *S/CYS8* maintenue pendant cette période. Ces données confirment que la co-expression d'inhibiteurs de protéases contre les protéases C1A est une stratégie prometteuse pour augmenter les rendements en protéine recombinante dans les plantes. Elles indiquent en revanche la pertinence d'études additionnelles pour améliorer cette approche, tenant compte de l'influence de l'âge physiologique des feuilles et de la présence de protéases de classes fonctionnelles alternatives.

### 3.3 Abstract

The expression of clinically useful proteins in plants has been bolstered by the development of high-yielding systems for transient protein expression using agroinfiltration. There is a need now to know more about how host plant development and metabolism influence the quantity and quality of recombinant proteins. Endogenous proteolysis is a key determinant of the stability and yield of recombinant proteins in plants. Here we characterised cysteine (C1A) and aspartate (A1) protease profiles in leaves of the widely used expression host *Nicotiana benthamiana*, in relation with the production of a murine IgG, C5-1, targeted to the cell secretory pathway. Agroinfiltration significantly altered the distribution of C1A and A1 proteases along the leaf age gradient, with a correlation between leaf age and the level of proteolysis in whole-cell and apoplast protein extracts. The co-expression of tomato cystatin *S/CYS8*, an inhibitor of C1A proteases, alongside C5-1 increased antibody yield by nearly 40% after the usual 6-day incubation period, up to ~3 mg per plant. No positive effect of *S/CYS8* was observed in oldest leaves, in line with an increased level of C1A protease activity and a very low expression rate of the inhibitor. By contrast, C5-1 yield was greater by an additional 40% following 8- to 10-day incubations in younger leaves, where high *S/CYS8* expression was maintained. These findings confirm that the co-expression of recombinant protease inhibitors is a promising strategy for increasing recombinant protein yields in plants, but that further opportunity exists to improve this approach by addressing the influence of leaf age and proteases of other classes.

### 3.4 Introduction

Plant-based protein expression platforms are a useful answer to the growing demand for biological therapeutics and diagnostics worldwide (Davies, 2010; Paul and Ma, 2011). Plant cells, unlike bacteria or yeast, can correctly fold, assemble and modify complex proteins of mammalian origin, such as therapeutic and diagnostic antibodies. Plants also present advantages in terms of safety, capital investment, and ease of scaling-up compared to mammalian cell-based production systems (Karg and Kallio, 2009; Paul and Ma, 2011). Much progress has been made to understand basic processes underlying heterologous protein expression in plants (Gomord *et al.*, 2005; Streatfield, 2007), leading to tangible improvements in yield and product quality that have confirmed the position of plants as useful commercial expression hosts (Maxmen, 2012).

Originally most useful as a method to quickly screen transgene expression constructs (Kapila *et al.*, 1997), transient expression in agroinfiltrated plant leaves has developed into the fastest and most convenient production platform for plant-made biopharmaceuticals (Komarova *et al.*, 2010; Rybicki, 2010). This technique takes advantage of the ability of *Agrobacterium* species to transfer a transcriptionally competent segment of DNA, the T-DNA, into the plant host cell, where it is then directed to the nucleus (Gelvin, 2003). A number of transient expression systems have been devised, that enable the production of milligram quantities of recombinant proteins within a few days using only a handful of plants (Huang *et al.*, 2009; Lindbo, 2007; Marillonnet *et al.*, 2004; Sainsbury and Lomonosoff, 2008; Vezina *et al.*, 2009). These systems often make use of a wild relative of tobacco, *Nicotiana benthamiana*, as the expression host. Well known as a model for studies on plant-pathogen interactions (Goodin *et al.*, 2008), *N. benthamiana* grows quickly and is easily amenable to agroinfiltration for high-level protein production. As a result, this species has also become somewhat of a model plant for the transient expression of foreign proteins.

Despite major advances, the successful production of heterologous proteins in plants is sometimes limited by losses due to proteolysis (Badri *et al.*, 2009; Benchabane *et al.*, 2009; Outchkourov *et al.*, 2003; Schiermeyer *et al.*, 2005; Sharp and Doran, 2001). Mammalian antibodies, in particular are known to be degraded *in planta* and during extraction, resulting in contamination of antibody preparations and, potentially, reduced fidelity of the protein product (De Muynck *et al.*, 2010; Hehle *et al.*, 2011; Lombardi *et al.*, 2010; Sainsbury *et al.*, 2010). Proteases are involved in many aspects of plant biology, including development, nutrient remobilisation during senescence, and defense against pathogens (Liu *et al.*, 2008; Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008). As such, the impact of proteolysis on both the quantity and quality of recombinant proteins might vary with the

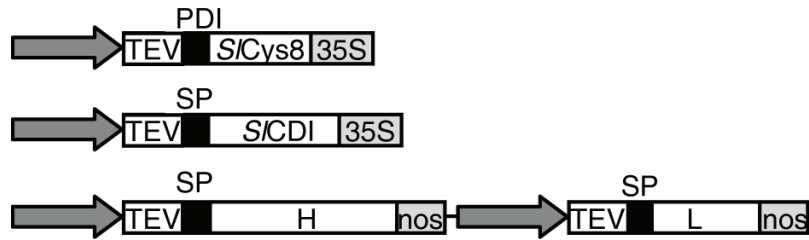
developmental stage of plant tissues. Endogenous protease patterns in the host plant could also be influenced by the production method itself, which may significantly alter the leaf proteome and protease complement (Goulet *et al.*, 2010b).

The co-expression of recombinant protease inhibitors has been proposed as a way to reduce the impact of plant proteases on recombinant protein yield (Benchabane *et al.*, 2008). Examples include protection of rhizosecreted antibodies in the growth medium of transgenic tobacco lines (Komarnytsky *et al.*, 2006); and protection during extraction from transgenic potato leaves (Rivard *et al.*, 2006), in which protein turnover was also modified to allow improved yield of transiently expressed recombinant proteins (Goulet *et al.*, 2010a). Most recently, this approach has been used to improve the expression of a transiently expressed antibody in *N. benthamiana* leaves through the co-secretion of protease inhibitors (Goulet *et al.*, 2012). Little is still known, however about how this strategy relates to the host plant's physiology and development, or to the reported substantial effects of agroinfiltration on protein expression and secretion (Goulet *et al.*, 2010b). Here we assessed the abundance and relative distribution of major protease activities in whole-leaf and apoplastic protein extracts of *N. benthamiana* through time and along the leaf age gradient, to investigate the influence of leaf age and agroinfiltration on recombinant protein quantity and quality. We used the human blood typing IgG antibody C5-1 as a model protein of clinical interest (Vezina *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2012), and two well characterized protease inhibitors from tomato, *SICDI* and *SICYS8*, to confirm the positive impact of co-expressed stabilizing inhibitors *in planta*.

## 3.5 Materials and Methods

### 3.5.1 Expression constructs and agroinfiltration

C5-1, *SICDI* and *SICYS8* were expressed fused to an N-terminal signal peptide sequence allowing for cellular secretion. The coding sequences of *SICDI* and *SICYS8* were placed downstream of a double *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter, and flanked with the *Tobacco etch virus* (TEV) enhancer sequence and CaMV 35S terminator (**Figure 3.1**).



**Figure 3.1** Binary vectors for C5-1, *S/CYS8* and *S/CDI* expression. The constructs were devised for targeting the proteins to the apoplast. Each construct included a duplicated version of the CaMV 35S constitutive promoter (arrow), the TEV enhancer sequence (TEV), the respective protein-coding sequences (*S/CYS8*, *S/CDI*, H and L for C5-1 heavy and light chains) and a CaMV 35S terminator (35S) or nopaline synthase terminator (nos) sequence. Constructs for *S/CYS8* secretion included the coding sequence of alfalfa protein disulphide isomerase signal peptide (PDI). Constructs for C5-1 and *S/CDI* included the native signal peptide (SP) of these proteins.

The heavy and light chains of C5-1 were expressed using a similar gene cassette, except for the use of a nopaline synthase (nos) terminator and the insertion of both transgene sequences within a single binary vector (**Figure 3.1**). Vector constructs for *S/CDI* and C5-1 including their native signal peptide were described earlier (Goulet *et al.*, 2010b; Goulet *et al.*, 2012). For the cystatin, DNA sequences for *S/CYS8* (Girard *et al.*, 2007) and the signal peptide of *Medicago sativa* protein disulphide isomerase (PDI) (Shorrosh and Dixon, 1991) were first PCR-amplified, and then fused by homology overlap extension PCR with the addition of 5' BsrGI and a 3' NcoI restriction sites for insertion into a modified pUC plasmid such that the fusion was flanked in 5' with CaMV 35S promoter and TEV enhancer sequences, and in 3' with the CaMV 35S terminator sequence. The resulting expression cassette was transferred into the plant binary vector pCambia 2300 (CAMBIA, Canberra, Australia) as for *S/CDI* and C5-1 chains. The binary vectors were electroporated in *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, and the cultures maintained in the presence of 50 µg/ml kanamycin and 50 µg/ml rifampicin. For infiltration, cultures were grown to stable phase and collected by centrifugation at 2,000 g. Bacterial cells were resuspended in MMA buffer (10 mM MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid), pH 5.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM acetosyringone) to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and incubated overnight at 4°C. The suspensions were let to stand at room temperature, and then pressure infiltrated into *N. benthamiana* leaves using a needleless syringe (D'Aoust *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Whole-leaf and leaf apoplast proteins

Forty-two to 49 day-old greenhouse-grown plants were used for the experiments. Whole-leaf proteins were extracted in 400  $\mu$ L of 10 mM MES buffer, pH 5.8, clarified by centrifugation at 10,000  $g$  for 10 min at 4°C, and kept at –80°C until use. Total proteins were assayed according to Bradford (1976), with bovine serum albumin as a protein standard (Sigma-Aldrich, Oakville ON, Canada). Leaf apoplast proteins were recovered as described (Goulet *et al.*, 2012), with some modifications. Freshly harvested leaves of the same age were weighed, washed in chilled double-distilled water, and submerged in chilled vacuum infiltration buffer (10 mM MES, pH 5.8). The leaves were then vacuum-infiltrated twice for 20 s with infiltration buffer, dried off to remove excess buffer, carefully rolled in a homemade swiss-roll cylinder, and centrifuged at 4°C for 10 min at 1,000  $g$  to collect the vacuum infiltrate. Protein solutions were centrifuged at 6,000  $g$  for 5 min at 4°C to discard *A. tumefaciens* cells. Protein content was assayed according to Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard, and kept at –80°C until use.

### 3.5.3 Protease assays

Protease activities were assayed by the monitoring of substrate hydrolysis progress curves using the following synthetic fluorogenic substrates (Peptides International, Louisville KY, USA): Z-Phe-Arg-methylcoumarin (MCA) for C1A cathepsin L-like Cys proteinases, and MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> for A1 cathepsin D/E-like Asp proteinases. Substrate hydrolysis reactions with whole-leaf and apoplast protein extracts (36 ng protein  $\mu$ L<sup>-1</sup>) were allowed to proceed at 25°C in 50 mM MES, pH 5.8, containing 10 mM L-Cys for Cys protease assays. Protease activity levels were monitored using a Fluostar Galaxy microplate fluorimeter (BMG, Offenburg, Germany), with excitation and emission filters of 360 and 450 nm, respectively, for the MCA substrate; or of 340 and 400 nm, respectively, for the MOCAC substrate. Three independent (biological) replicates were used for each assay.

### 3.5.4 Immunodetections

*S/CDI*, *S/CYS8* and C5-1 were immunodetected by Western blotting following 10% (w/v) SDS-PAGE and electrotransfer onto nitrocellulose membranes. Whole-leaf proteins were extracted in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche, Laval QC, Canada) by disrupting tissue with tungsten carbide beads (QIAGEN, Mississauga ON, Canada) in a Mini-Beadbeater apparatus (BioSpec, Bartlesville OK, USA). *S/CDI* was detected with commissioned polyclonal IgY antibodies raised in chicken against a hydrophilic surface loop of the protein (Khalf *et al.*, 2010) (Agrisera, Vännäs, Sweden) and alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-chicken IgY secondary antibodies (Sigma-Aldrich). *S/CYS8* was detected with commissioned polyclonal IgG antibodies raised in rabbit against bacterially expressed *S/CYS8* (Girard *et al.*, 2007) (Agrisera) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG as secondary antibodies (Sigma-Aldrich). C5-1 was detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich). Human IgG (Innovative Research, Burlington ON, Canada) was used as an antigen for C5-1 on activity blots, which was then detected with an alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgG antibody (Sigma-Aldrich).

### 3.5.5 C5-1 quantification

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plates for C5-1 quantification (Becton Dickinson, Mississauga ON, Canada) were coated with 3.75 µg/mL goat anti-mouse heavy chain-specific IgG1 (Sigma-Aldrich) in 50 mM carbonate buffer (pH 9.0) at 4°C for 16-18 h. The plates were washed three times in 10 mM phosphate-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T), blocked through a 1-h incubation in 1% (w/v) casein in phosphate-buffered saline (PBS) (Pierce, Rockford IL, USA) at 37°C, and washed three times in PBS-T. A standard curve was generated for each plate with 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 and 60 ng/mL of purified mouse IgG1 (Sigma-Aldrich). All dilutions (control and samples) were performed in a control extract from tissue infiltrated with a mock inoculum so that any matrix effect was eliminated. The plates were incubated with protein samples and standard curve dilutions for 1 h at 37°C and then washed three times in PBS-T. The plates were then incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (0.2 µg/mL in blocking solution) (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA, USA) for 1 h at 37°C. Washes with PBS-T were repeated, and the plates incubated with the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine Sure Blue peroxidase substrate (KPL; www.kpl.org). The reaction was stopped by the addition of 1 N HCl, and



the absorbance read at 450 nm. Each sample was assayed in triplicate, and antibody concentrations were interpolated in the linear portion of the standard curve. Three independent (biological) replicates were used for each assay.

### **3.5.6 C5-1 activity**

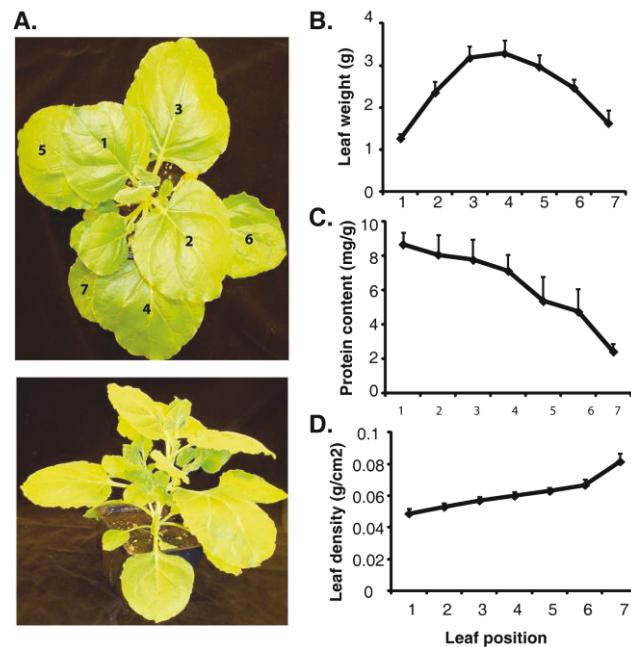
ELISA plates for C5-1 activity monitoring (Immulon 2HB; ImmunoChemistry Technologies, Bloomington MN, USA) were coated with human IgG (Innovative Research) at a concentration of 2 µg/mL. The plates were washed in 0.85% (w/v) NaCl, blocked with 100 mM PBS containing 0.25% (w/v) casein and 0.01% (w/v) thiomersal at 37°C for 1 h, and washed three times in 0.85% (w/v) NaCl. All dilutions (control and samples) were performed in a control extract obtained from tissue infiltrated with a mock inoculum so that any matrix effect was eliminated. The plates were incubated with protein samples for 1 h at 37°C, washed three times in 0.85% (w/v) NaCl, and then incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibodies (0.02 µg/mL in blocking solution) (Jackson ImmunoResearch) for 1 h at 37 °C. Washes with 0.85% (w/v) NaCl were repeated, and the plates incubated with the TMB Sure Blue peroxidase substrate (KPL). The reaction was stopped by the addition of 1 N HCl, and the absorbance was read at 450 nm. Each sample was assayed in triplicate. Three independent (biological) replicates were used for each assay.

### **3.5.7 Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using the SAS program, version 9.1 (SAS Institute, Cary NC, USA). Analysis of variance (ANOVA) and PROC MIXED procedures were used to compare protease activities. ANOVA and PROC GLM procedures were used to compare yields of C5-1 expressed alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI*. Contrast calculations were made when the ANOVA were significant at an alpha value threshold of 0.05.

### 3.6 Results

*N. benthamiana* as an expression host was first characterised in terms of leaf biomass for protein extraction, in order to gain insight into the relationship between physiological state along the leaf-age gradient and recombinant protein yield. The plants used were between 42 and 49 day-old, depending on the season, with eight fully expanded leaves arranged in an alternate pattern along the main stem. These leaves were numbered from the apex down so that leaf number correlates with leaf age (**Figure 3.2A**). The eighth leaf was not used as it was frequently senescent or damaged by contact with the pots of other plants. Measurement of physical characteristics revealed large variation in the biomass of each leaf (**Figure 3.2B**). There was a steady increase in leaf density with leaf age, but leaf mass was mostly determined by the leaf area. Protein content on a fresh weight tissue basis decreased significantly with leaf age (ANOVA,  $P < 0.05$ ), despite an increase in leaf density (**Figure 3.2C, D**).



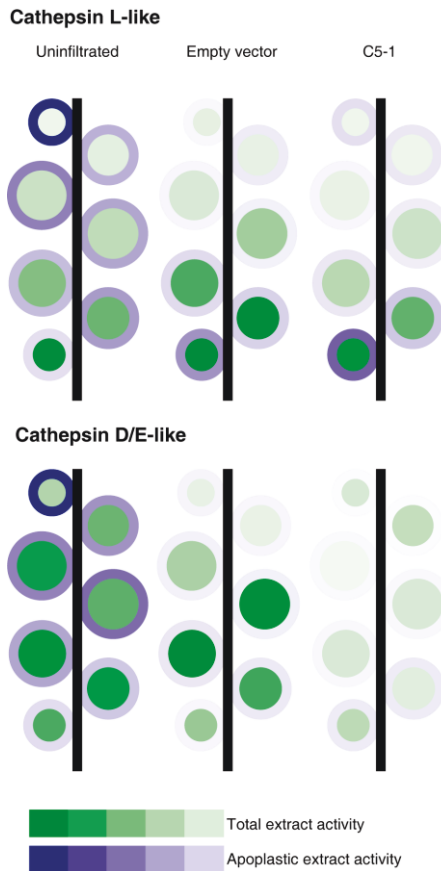
**Figure 3.2** Characterisation of *N. benthamiana* leaf biomass. (A) Representative 49 day-old *N. benthamiana* plant (aerial and side views), with leaves numbered from the apex down. (B) Leaf weight given as a mean of eight measurements for each leaf position  $\pm$  SE. (C) Mean protein content in total extracts from three biological replicates  $\pm$  SE. (D) Leaf density calculated by dividing the weight of leaf discs by their area. Each point is the mean of three independent (biological replicate) values  $\pm$  SE.

### 3.6.1 Endogenous proteolytic activities are influenced by leaf age and agroinfiltration

Cathepsin D/E-like (A1 Asp protease) and cathepsin L-like (C1A Cys protease) activities have recently been shown to be the most abundant activities in total and apoplastic extracts of *N. benthamiana* leaves (Goulet *et al.*, 2012). Here we assessed how these activities change with leaf age, and whether they are affected by agroinfiltration or by expression of recombinant proteins. Since many glycoproteins of clinical interest are secreted to the apoplast, *in vitro* protease assays with cathepsin L and cathepsin D/E-specific fluorogenic peptides substrates were conducted for both whole-leaf and leaf apoplast protein extracts (**Figure 3.3**). A malate dehydrogenase assay first showed that less than 2% of the activity measured for this enzyme in whole-leaf extracts was found in the apoplast extracts (not shown), indicating a low level of contamination in apoplastic protein preparations as also observed previously (Goulet *et al.*, 2010b). As expected, cathepsin L and cathepsin D/E activities were detected in both apoplastic and total extracts (**Figure 3.3**). On a protein basis, cathepsin L activity was higher in apoplast extracts than in whole-leaf extracts of Leaf 1, at similar levels in Leaf 2 and Leaf 3, and two to thirteen times higher in whole-leaf extracts of older leaves, where extracellular activity decreased with leaf age (**Supplementary Table S3.1**). By comparison, cathepsin D/E activity was nine to 120-fold higher in apoplast extracts. Considering that 80 to 100-fold more protein was found in whole-leaf extracts than in apoplast extracts, a major fraction of this proteolytic activity was, therefore, found in the apoplast. A significant leaf age-dependent increase in cathepsin L activity was observed for whole-leaf extracts (ANOVA,  $P < 0.001$ ), consistent with previous studies implicating C1A Cys proteases in physiological processes related to leaf maturation and senescence (Liu *et al.*, 2008).

To investigate the effects of agroinfiltration and recombinant protein expression, leaves were infiltrated with either a bacterial culture containing an empty expression vector, or with a 1:1 mixture of cultures harbouring expression vectors encoding either the C5-1 antibody or the P19 silencing suppressor (**Figure 3.3**). While there was no significant change compared to uninfiltrated plants in the profile of cathepsin L activity in whole-leaf extracts at six days post infiltration (dpi) (**Figure 3.3A**), cathepsin D/E activity significantly decreased in response to the control (empty vector) infiltration, and even further decreased following expression of C5-1 and P19 (ANOVA,  $P < 0.001$ ) (**Figure 3.3B**). A significant decrease of both cathepsin L and cathepsin D/E activities was observed in apoplast extracts of agroinfiltrated leaves (ANOVA,  $P < 0.05$ ), although cathepsin D/E activity now no longer decreased along the leaf age gradient and cathepsin L activity actually increased with leaf age.

Together, these results suggest that major proteolytic activities are modified by both agroinfiltration and heterologous protein expression in *N. benthamiana* leaves. In particular, extracellular protease activity patterns along the leaf age gradient were extensively modified during the transient expression phase.



**Figure 3.3** Major proteolytic activities in *N. benthamiana* leaves. Plants are represented as schematic diagrams where the area of each circle represents the weight of the corresponding leaf. Colour intensities indicate cathepsin L (A) and cathepsin D/E-like (B) activity levels detected for each leaf, relative to the maximum value obtained. Inner green circles represent whole-leaf extract activity, outer blue circles apoplastic extract activity. Each value is the mean of three independent activity values assayed using protease family-specific fluorogenic peptide substrates (fluorescence units/s.mg protein). Samples were taken at 6 dpi from plants infiltrated with *Agrobacteria* containing an empty vector, from plants infiltrated with *Agrobacteria* containing the C5-1 and P19 expression vectors, or from uninfiltrated plants of the same age.

### 3.6.2 The antibody-stabilizing effect of co-expressed protease inhibitors is leaf age-dependent

The co-expression of protease inhibitors has recently been shown to improve the accumulation of transiently expressed C5-1 in *N. benthamiana* leaves (Goulet *et al.*, 2012). Here we monitored the impact of co-expressed inhibitors along the leaf age gradient to measure the potential of this approach at the plant scale, in relation with leaf development, biomass, and extractable protein yield. Two tomato inhibitors were used for the assays: the eighth domain of multicystatin *S/CYS8* to target cathepsin L proteases (Girard *et al.*, 2007), and the Kunitz cathepsin D inhibitor *S/CDI* to target cathepsin D/E proteases (Brunelle *et al.*, 2005). C5-1 was co-expressed with P19 and either inhibitors, after mixing *Agrobacteria* cultures containing the corresponding expression vectors.

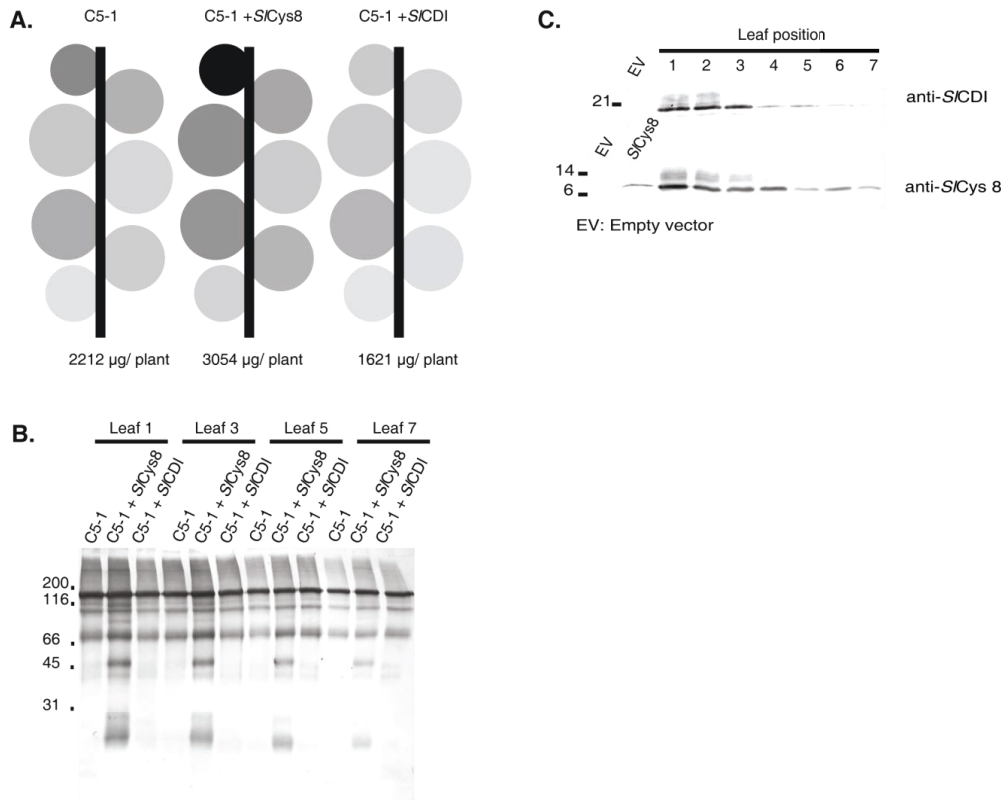
An ELISA was performed to quantify C5-1 in whole-leaf protein extracts from tissue harvested at 6 dpi. Antibody levels on a total soluble protein basis generally decreased with leaf age, with the exception of Leaf 5 (**Figure 3.4**). Co-expressed *S/CYS8* had a positive impact on C5-1 accumulation throughout the plant, whereas *S/CDI* had a slightly negative impact (**Figure 3.4A**). In terms of yield per leaf, *S/CYS8* coexpression had a significant positive impact in Leaves 1, 2, 3 and 4, with the effect most marked in Leaf 3 (**Table 3.1**). Overall, this effect translated into a 38% increase in the yield of antibody product per plant, from 2.21 to 3.05 mg per plant under our experimental conditions. By comparison, *S/CDI* had a negative impact on yield in Leaf 1 and Leaf 2, but no significant impact in older leaves. The profile of C5-1 antibody fragments in Leaves 1, 3, 5 and 7 was visualised by Western blotting (**Figure 3.4B**). Four major bands were detected in leaves expressing C5-1 alone: a major band at ~150 kDa, presumably representing the full antibody; and three fragments migrating at about 120, 100 and 80 kDa during SDS-PAGE. Additional bands were detected when *S/CYS8* was co-expressed, at about 90, 45 and 25 kDa. The same pattern as C5-1 alone was observed on the immunoblots when *S/CDI* was co-expressed. Decreased C5-1 product accumulation as a function of leaf age could be observed for all treatments, with a similar decrease in *S/CYS8*-specific antibody fragments as for the bands found in the control treatment with no co-expressed inhibitor (**Figure 3.4B**).

**Table 3.1** C5-1 yield ( $\mu\text{g}$ ) per leaf and per plant in *N. benthamiana* plants transiently expressing C5-1 alone or C5-1 with *S/CYS8* or *S/CDI*

Leaf	C5-1	C5-1 + <i>S/CYS8</i>	C5-1 + <i>S/CDI</i>
1	373 $\pm$ 95.9	535 $\pm$ 28*	179 $\pm$ 30*
2	440 $\pm$ 6,32	500 $\pm$ 41*	276 $\pm$ 35*
3	442 $\pm$ 21,4	760 $\pm$ 23*	400 $\pm$ 48
4	325 $\pm$ 75,9	374 $\pm$ 29*	253 $\pm$ 53
5	380 $\pm$ 113	541 $\pm$ 129	354 $\pm$ 9.6
6	204 $\pm$ 84,9	258 $\pm$ 99	163 $\pm$ 54
7	16 $\pm$ 2,53	25 $\pm$ 2,31	19 $\pm$ 7,53
Plant	2,212 $\pm$ 275	3,054 $\pm$ 326	1,621 $\pm$ 342

\* Significantly different to C5-1 expressed alone (ANOVA;  $P < 0.05$ ). Values are the mean of three independent (biological) replicates  $\pm$  SE.

Western blots were performed for *S/CYS8* and *S/CDI* along the leaf-age gradient to assess why co-expressing the inhibitors had more impact in younger leaves, whether positive or negative (**Figure 3.4C**). Expression of both inhibitors appeared to decrease with leaf age, with *S/CDI* and *S/CYS8* levels dropping off at Leaf 4 and Leaf 5, respectively. This mirrored the expression profile of C5-1, and suggested that the impact of the inhibitors on C5-1 product accumulation was significant only when a sufficient amount of inhibitor was expressed, irrespective of C5-1 expression level.

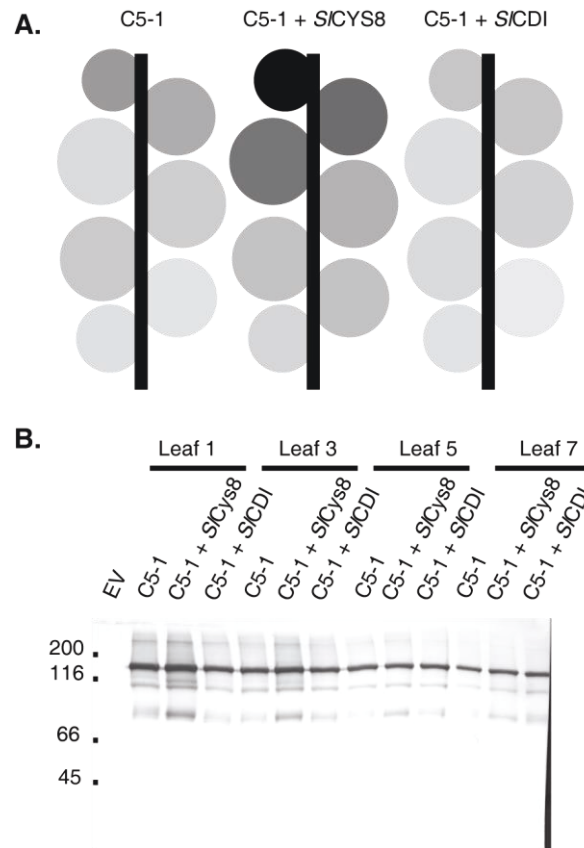


**Figure 3.4** Effect of co-expressed *S/CYS8* or *S/CDI* on C5-1 accumulation. (A) Plants are represented as schematic diagrams where the area of each circle represents the weight of the corresponding leaf. Levels of grey are proportional to the amount of C5-1 on a total soluble protein basis, as determined by quantitative ELISA with a murine IgG standard and normalised to the maximum amount obtained. Leaves were infiltrated with the C5-1 expression vector alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI* expression vectors. Each value is the mean of three independent (biological) replicates. Numbers below each plant indicate mean antibody production level for the whole plant. (B) Immunodetection of C5-1 at 6 dpi in Leaf 1, Leaf 3, Leaf 5 and Leaf 7, expressed either alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI*. The proteins were detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG, after SDS-PAGE under non-reducing conditions. (C) Immunodetection of *S/CYS8* and *S/CDI* at 6 dpi in Leaves 1 to 7, following SDS-PAGE under reducing conditions. *S/CYS8* was detected with polyclonal primary antibodies raised in rabbit, *S/CDI* with IgY primary antibodies raised in chicken. The primary antibodies were detected with appropriate alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies. EV, mock infiltration with an empty vector.

### 3.6.3 *S/CYS8*-stabilized C5-1 is biologically active

An ELISA-based C5-1 activity assay was conducted using human IgG antibodies as a test antigen, to determine whether the C5-1 antibody fragments detected at higher levels or newly appeared along with *S/CYS8* were biologically active (**Figure 3.5**). C5-1 activity levels on a total soluble protein basis generally decreased with leaf age (**Figure 3.5A**), reflecting the quantitative profile of C5-1 accumulation (**Figure 3.4**). Most interestingly, co-expressed *S/CYS8* had a positive impact on C5-1 activity, with a significant effect in the four upper leaves (ANOVA,  $P < 0.05$ ) (**Supplementary Figure S3.1**), while *S/CDI* had generally a negative impact on C5-1 activity (**Figure 3.5A**). An activity blot showed which fragments were able to bind antigens, presumably because they contained at least one Fab fragment (**Figure 3.5B**). Four bands were detected in leaves expressing C5-1 alone, migrating at ~150, 120, 100 and 80 kDa and likely corresponding to the four bands detected on qualitative immunoblots (*see* **Figure 3.4B**). The same pattern was observed when *S/CYS8* was co-expressed with C5-1, but the bands were more intense. By comparison, the same pattern as C5-1 alone was observed when *S/CDI* was co-expressed, but with the bands a little less intense. These results demonstrate overall that the additional fragments stabilised in the presence of *S/CYS8* (**Figure 3.4**), while possibly accounting for some of the increase in C5-1 content, were barely active against human IgG.

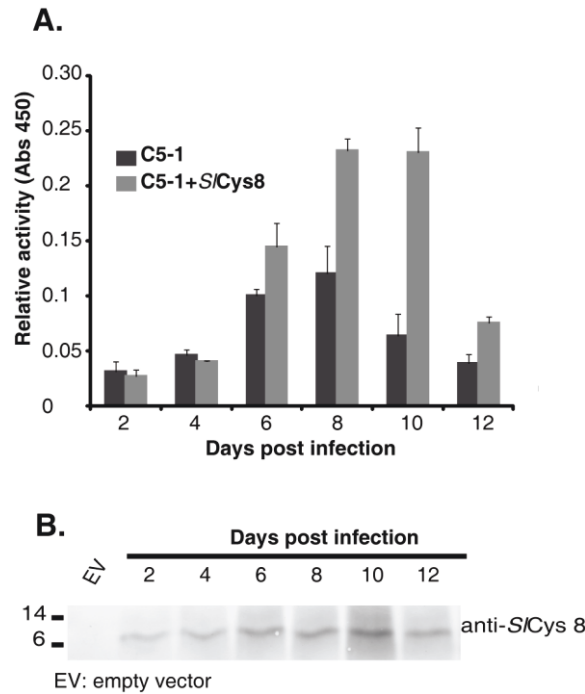




**Figure 3.5** Biological activity of C5-1 expressed alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI*. (A) Plants are represented as schematic diagrams, where the area of each circle represents the weight of the corresponding leaf. Levels of grey represent relative C5-1 activities (absorbance units) on a total soluble protein basis, as measured by ELISA and normalised to the maximum amount obtained. Each value is the mean of three biological replicates. (B) Immunodetection of C5-1 activity at 6 dpi in Leaf 1, Leaf 3, Leaf 5 and Leaf 7, with the recombinant antibody expressed alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI*. Antibody activity was inferred from binding of human IgG following electroblotting of non-reduced SDS-PAGE-separated proteins onto nitrocellulose sheets. The human IgG antigen of C5-1 was then detected with a goat anti-human antibody conjugated with alkaline phosphatase. EV, mock infiltration with an empty vector.

### 3.6.4 Co-expressed *S/CYS8* extends the accumulation phase of C5-1 in leaves

Although cathepsin L activity potentially inhibited by *S/CYS8* was highest in older infiltrated leaf tissues (**Figure 3.3**), *S/CYS8* levels in these tissues were apparently too low to have a positive impact on C5-1 accumulation (**Figure 3.4**). We reasoned that in the most productive younger leaves, where *S/CYS8* had a significant impact, the amount of active C5-1 could be improved as leaf ages if *S/CYS8* remained at high enough concentration. Even though leaves are two to three positions further from the apex after the usual 6-days incubation period, *S/CYS8* expression was expected to remain high in tissue that is younger at the time of infiltration due to the inherent stability of this protein and to the known effect of P19 to prolong high transgene expression in *N. benthamiana* leaves (Voinnet *et al.*, 2003). Supporting this, sampling tissue every 2 days until day 12 from Leaves 2 to 4 expressing C5-1 alone or along with *S/CYS8* showed the impact of *S/CYS8* to be much greater at later time points (**Figure 3.6A**). There was no apparent impact of *S/CYS8* on the accumulation of active C5-1 at 2 and 4 dpi, and a similar positive effect at 6 dpi as measured earlier for 6-day incubations (see **Table 3.1**). On the other hand, while the level of C5-1 then increased slightly to reach a maximum at 8 dpi when expressed alone, *S/CYS8* had a much greater impact than at earlier time points. Furthermore, whereas the level of C5-1 expressed alone had decreased at 10 dpi, the amount of active antibody was maintained at its highest level in the presence of *S/CYS8*. Concomitant with the improved levels of active C5-1, *S/CYS8* accumulation increased with time post infiltration and reached maximum expression at day 10, after which it decreased (**Figure 3.6B**). These results suggest that maintaining high levels of *S/CYS8* along the leaf gradient could significantly help to reduce the turnover of C5-1 and allow for a much greater accumulation of active antibody after a slightly longer incubation period.



**Figure 3.6** Time-course accumulation of biologically active C5-1 expressed alone or along with *S/CYS8*. Samples (from Leaf 2, Leaf 3 and Leaf 4) were collected at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 dpi from leaf tissue transiently expressing C5-1 alone or along with *S/CYS8*. (A) The relative activity of C5-1 was measured by ELISA on a total soluble protein basis. Each value is the mean of three independent (biological) replicates  $\pm$  SE. (B) Immunodetection of *S/CYS8* at different time points following SDS-PAGE of leaf proteins under reducing conditions. The cystatin was detected with polyclonal primary antibodies raised in rabbit and an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody. EV, mock infiltration with an empty vector.

### 3.7 Discussion

Transient expression in agroinfiltrated plants is a rapid and simple way of producing large amounts of recombinant proteins in plants. This approach also allows for the parallel modification of host cell processes through the co-expression of accessory proteins permitting, for example, the engineering of recombinant protein post-translational modifications (Vézina *et al.*, 2009; Mamedov *et al.*, 2012) or the implementation of specific protein maturation processes (Saunders *et al.*, 2009). In the current context of therapeutic protein production where both yield and consistent quality are important for the development of plant-based production platforms (Davies *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2012), there is a need to elucidate metabolic processes governing the production and modification of

recombinant proteins *in planta* and to understand how these processes are affected by plant development and physiology. A model was proposed recently to link physiological parameters in *N. tabacum* with predictions for transient expression yields and the costs associated with upstream production and downstream purification (Buyel and Fischer, 2012). Here we investigated the impact of leaf age and agroinfiltration on major proteolytic activities in leaves of the model protein expression platform *N. benthamiana*, and the possible influence of these activities on recombinant protein yields. By co-expressing full-size IgG such as C5-1 (this study) or the chimeric anti-tumor antibody C2B8 (not shown) with protease inhibitors selected based on their inhibitory potency against the host plant's proteases, we confirm the potential of controlling endogenous proteolysis to increase the accumulation of functional mammalian antibodies at the whole plant scale, and show that leaf developmental stage has a significant impact on the final outcome. Yield improvements could also be observed using an alternative syringe-free, vacuum-based leaf infiltration procedure (unpublished data), clearly suggesting the general usefulness of protease inhibitors as effective stabilising agents for mammalian antibodies transiently expressed in *N. benthamiana* leaves.

A1 and C1A protease activities monitored in non-infiltrated plants generally increased with leaf age in whole-leaf protein extracts, fitting with the role of proteases in nutrient mobilisation from older tissues as part of a source-sink transition (Liu *et al.*, 2008). By contrast, the same activities in apoplast extracts decreased with leaf age, which might reflect a shift away from defence against pathogens, in which proteases are also involved. Agroinfiltration has an extensive impact on the apoplastic proteome of *N. benthamiana* leaves (Goulet *et al.*, 2010b), and, accordingly, we found that it had a substantial effect on the distribution of proteolytic activities along the leaf age gradient. Following agroinfiltration, A1 (cathepsin D/E) activity decreased in the apoplast, resulting in no correlation with leaf age. Interestingly, cathepsin D/E activity significantly decreased during C5-1 expression, relative to the control infiltration. The reason for this is unclear but may be related to additional pressures on the secretory system, through which many Asp proteases transit (Goulet *et al.*, 2012). Cathepsin L activity in the apoplast also decreased following agroinfiltration except in the oldest leaves, resulting in a different profile where C1A-type activity now increased with leaf age for both whole-leaf and apoplast extracts. Both A1 proteases (Guevara *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2004) and C1A proteases (Gilroy *et al.*, 2007; Kaschani *et al.*, 2010) are known to be upregulated or relocated in response to pathogenic microbes; here we show that this effect may depend on leaf age in *N. benthamiana*.

We transiently expressed the blood-typing murine IgG C5-1 in leaves to assess the impact of variable proteolytic activity profiles on recombinant protein yield along the leaf age gradient. A multi-fragment pattern has been well documented for this antibody whether expressed in transgenic alfalfa

(Khoudi *et al.*, 1999) or transiently in *N. benthamiana* with viral (Sainsbury *et al.*, 2008) or non-viral (Vézina *et al.*, 2009) expression systems. While the pattern of immunodetected fragments did not change between leaves, the amount of antibody decreased markedly in older leaves, both in terms of total soluble protein and yield per unit fresh weight. The co-secretion of *S/CYS8*, an inhibitor of C1A Cys proteases, resulted in the appearance of additional fragments as well as in an increased accumulation of functional antibody all along the leaf age gradient. However, this positive effect of *S/CYS8* was statistically significant only in the first four leaves, where *S/CYS8* was also expressed well. Together, these observations show that C1A proteases play a role in limiting the accumulation of recombinant antibodies in *N. benthamiana* leaves and that this effect can be significantly limited by the presence of an inhibitor of C1A proteases to increase the yield by nearly 40% on a whole-plant scale.

The non-significant effect of *S/CYS8* in older leaves was likely related to low expression of both C5-1 and the recombinant inhibitor on a total soluble protein basis. It has been shown that the CaMV 35S promoter is most efficient in younger leaves of *N. benthamiana* (Wydro *et al.*, 2006), and we found here an increase in cathepsin L activity following agroinfiltration in older leaves (**Figure 3.3**). Considering this, the protective effect of *S/CYS8* was probably dose-dependent and limited in those leaf tissues exhibiting a high Cys protease to *S/CYS8* balance, whether due to a low level of recombinant cystatin or to the age-related increase of endogenous protease activity. In agreement with this hypothesis, continued high-level expression of *S/CYS8* over longer incubation times in younger leaves led to an improved protective effect on active C5-1. This result is encouraging as it suggests that further yield improvements could be achieved using expression systems or promoters able to drive high level expression in older tissues. In particular, Leaf 5 and Leaf 6, which account for about 30% of the total biomass (*see* **Figure 3.2**), contributed here to 26% of the antibody yield despite a non-significant effect of *S/CYS8* expressed at very low levels.

In summary, the overall yield of a transiently expressed mammalian antibody in *N. benthamiana* leaves appeared to be strongly influenced by endogenous protease activities, which could in turn be mitigated through the co-expression of a suitable recombinant protease inhibitor. We have mapped major endogenous protease activities in relation to leaf age, and shown these activities to be influenced by agroinfiltration and transient protein expression. Based on this, we evaluated the effect of co-expressing protease inhibitors on the resulting yield of a recombinant mammalian antibody, showing in particular the potential of tomato cystatin *S/CYS8* to improve the yield of active antibody on a whole plant scale. While this approach for enhancing foreign protein accumulation can result in up to 40% yield improvement per plant, the effect still remains non-significant in oldest leaves where proteolytic activities are stronger, especially in agroinfiltrated tissues. Work is underway

to improve the expression of *S/CYS8* along the leaf age gradient, with the aim of implementing low Cys protease to *S/CYS8* balances in both young, mature and older leaf tissues. Work is also underway to identify inhibitors complementary to *S/CYS8*, useful in further enhancing the accumulation of antibodies and other proteins. The presence of additional, albeit inactive fragments of C5-1 in *S/CYS8*-expressing leaves not only confirmed a strong stabilising effect of the tomato cystatin, but also indicated that C5-1 was susceptible to *S/CYS8*-insensitive proteases *in planta*. Active antibody yields thus could likely be further improved by the co-expression of inhibitors able to prevent antibody fragmentation into *S/CYS8*-stabilised fragments. No protection effect was observed here for *S/CDI*, but a significant stabilisation of C5-1 by this inhibitor cannot be excluded under some specific growth conditions (Goulet *et al.*, 2012). Experiments are currently underway to elucidate this question, keeping in mind the reported impact of plant growth conditions on the degradation and yield of another murine antibody expressed in *N. tabacum* (Stevens *et al.*, 2000).

### **3.8 Acknowledgments**

We thank Cesar Benavente for helpful technical assistance. This work was funded by a Strategic project grant from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada to D.M., supported in part –and conducted in collaboration with– Medicago inc.

### **3.9 Supporting information**

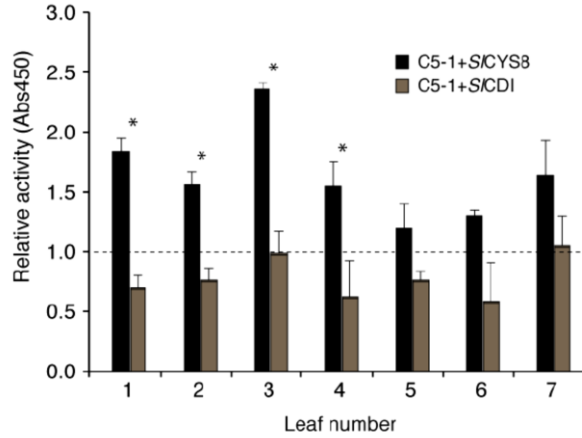
**Table S3.1** Proteolytic activities in whole leaf and apoplastic extracts of *N. benthamiana* leaves six days after infiltration with Agrobacteria containing an empty vector, or with Agrobacteria containing a C5-1 expression vector or uninfiltrated.

**Figure S3.1** Activity levels of C5-1 along the leaf age gradient.

**Table S3.1** Proteolytic activities (units/s) in whole leaf and apoplastic extracts of *N. benthamiana* leaves six days after infiltration with Agrobacteria containing an empty vector, or with Agrobacteria containing a C5-1 expression vector or uninfiltrated.

	Leaf #	Whole leaf extracts			Apoplastic extracts		
		Uninfiltrated	Empty vector	C5-1vector	Uninfiltrated	Empty vector	C5-1 vector
Cathepsin L-like	1	18,9 ± 2,68	26,9 ± 4,51	18,6 ± 2,78	82,4 ± 60,5	3,30 ± 0,62	13,3 ± 8,91
	2	28,5 ± 7,24	25,2 ± 1,55	18,9 ± 5,08	29,4 ± 8,31	8,50 ± 4,93	9,78 ± 4,26
	3	47,9 ± 16,7	35,8 ± 5,24	22,8 ± 1,14	44,1 ± 14,9	3,87 ± 0,78	4,24 ± 0,75
	4	56,6 ± 11,9	73,8 ± 7,82	46,9 ± 17,3	32,8 ± 16,5	6,99 ± 1,20	7,30 ± 2,48
	5	89,5 ± 25,8	109,8 ± 34,54	61,1 ± 22,6	25,2 ± 10,9	14,8 ± 2,96	10,3 ± 4,26
	6	98,6 ± 25,9	153,9 ± 23,95	101,9 ± 15,3	36,3 ± 21,3	18,2 ± 2,99	21,6 ± 11,8
	7	153,5 ± 20,9	155,8 ± 49,14	140,5 ± 24,3	12,8 ± 0,00	38,5 ± 13,0	54,4 ± 18,3
Cathepsin D/E-like	1	3,38 ± 1,51	1,28 ± 0,29	1,97 ± 0,95	359 ± 43,8	21,9 ± 5,40	6,20 ± 1,55
	2	5,19 ± 2,25	1,25 ± 0,23	2,84 ± 1,96	167 ± 63,4	17,8 ± 2,12	7,03 ± 1,90
	3	6,70 ± 3,21	3,66 ± 1,31	0,76 ± 0,12	190 ± 99,3	25,1 ± 7,87	10,3 ± 1,10
	4	5,44 ± 1,23	7,94 ± 1,57	1,90 ± 0,96	220 ± 51,5	29,2 ± 4,76	15,6 ± 7,50
	5	7,45 ± 2,73	8,28 ± 1,80	1,93 ± 0,38	145 ± 30,9	41,9 ± 10,8	15,1 ± 1,65
	6	6,98 ± 1,60	6,06 ± 0,84	1,53 ± 0,69	93 ± 37,5	37,9 ± 15,0	36,5 ± 5,23
	7	5,80 ± 0,78	4,16 ± 0,67	3,07 ± 1,36	62 ± 0,00	18,7 ± 4,81	37,4 ± 9,67

Values are the mean of three independent biological replicates ± SE.



**Figure S3.1** Activity levels of C5-1 along the leaf age gradient. Relative C5-1 activities in protein extracts from leaves transiently expressing the antibody alone or along with *S/CYS8* or *S/CDI* were estimated by ELISA, on a total soluble protein basis. Absorbance values for C5-1 alone in each leaf were given an arbitrary value of 1.0 (dashed line); values with co-expressed *S/CYS8* or *S/CDI* are presented, normalised for each leaf. Each bar is the mean of three independent (biological replicate) values  $\pm$  SE. Asterisks (\*) indicate significant differences compared to C5-1 alone (ANOVA,  $P < 0.05$ ).



## Chapitre 4

### **Diversion du protéome foliaire chez *Nicotiana benthamiana* pour l'enrichissement pré-extraction d'une protéine recombinante exprimée transitoirement**

*(Leaf proteome rebalancing in Nicotiana benthamiana for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein)*

Les résultats de ce chapitre ont été publiés récemment dans le périodique scientifique *Plant Biotechnology Journal* avec comme auteurs Stéphanie Robert, Marie-Claire Goulet, Marc-André D'Aoust, Frank Sainsbury et Dominique Michaud.<sup>1</sup> Un brevet provisoire a été déposé au préalable au Bureau des brevets des Etats-Unis (USPTO), avec les mêmes co-auteurs comme co-inventeurs.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Robert S, Goulet M-C, D'Aoust M-A, Sainsbury F, Michaud D (2015) Leaf proteome rebalancing in *Nicotiana benthamiana* for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein. *Plant Biotechnology Journal* doi:10.1111/pbi.12452.

<sup>2</sup> Robert S, Goulet M-C, D'Aoust M-A, Sainsbury F, Michaud D (2015) Jasmonic acid pathway activator. United States Patent and Trademark Office Patent Application No. 62/188,182, 2 July 2015.



## 4.1 Mise en contexte

Les résultats du chapitre précédent ont confirmé la pertinence de co-exprimer des inhibiteurs de protéases compagnons pour la protection de protéines recombinantes dans les feuilles du *N. benthamiana*. Cette première partie des travaux a aussi montré, par contre, que l'efficacité des inhibiteurs compagnons dépendait de la classe de protéases inhibées et du ratio *protéases/inhibiteurs* établi dans les tissus foliaires. Pour cette raison, les inhibiteurs co-exprimés n'ont pas permis une accumulation notable de la protéine d'intérêt dans les feuilles plus âgées, où leur taux d'expression était faible et où le niveau de protéases endogènes augmentait de manière significative.

Nous avons souhaité confirmer formellement, en complément aux travaux du premier article, que l'effet protecteur de l'inhibiteur *S/CYS8* sur l'anticorps C5-1 dépendait de son activité anti-protéasique et que le phénomène de protection survenait bel et bien au niveau du système de sécrétion cellulaire. Comme l'activité protéasique et l'identité des protéases diffèrent d'un organe ou d'un compartiment cellulaire à l'autre, nous avons voulu déterminer également si l'expression ciblée des inhibiteurs *S/CYS8* et *S/CDI*, co-exprimés conjointement ou isolément, pouvait montrer un effet positif différentiel sur l'accumulation d'anticorps C5-1. Afin de répondre à ces questions, nous avons évalué la teneur en C5-1 dans des feuilles accumulant *S/CYS8* ou son mutant inactif 'Q47P' (Sainsbury *et al.*, 2012) dans différents compartiments cellulaires; ou dans des feuilles exprimant ce même inhibiteur en combinaison avec l'inhibiteur *S/CDI*.

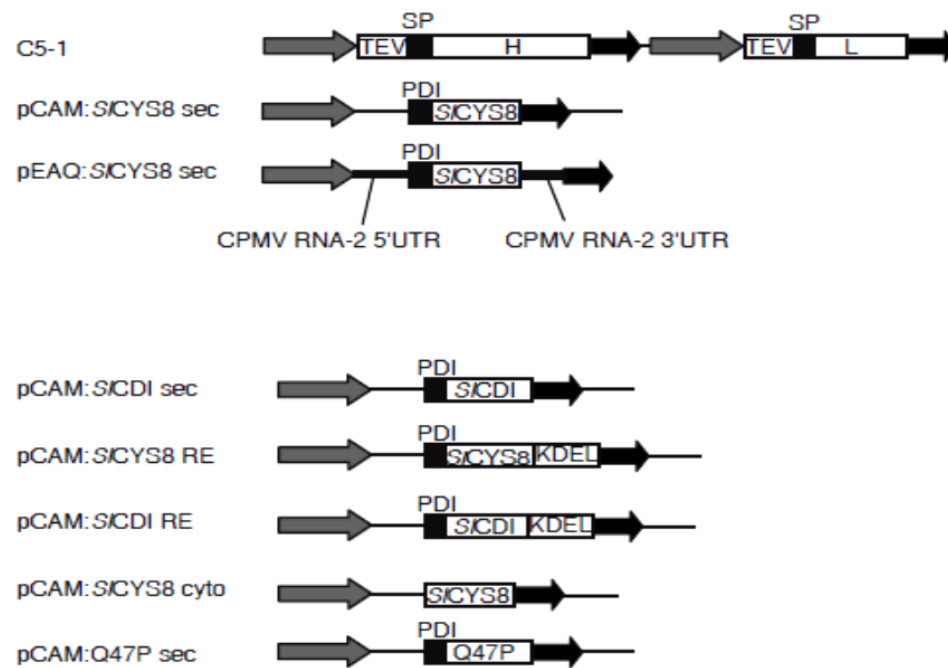
### 4.1.1 Quelques résultats complémentaires

#### 4.1.1.1 L'effet protecteur de *S/CYS8* sur l'anticorps C5-1 est lié à son activité anti-protéasique et à sa présence dans le système de sécrétion cellulaire

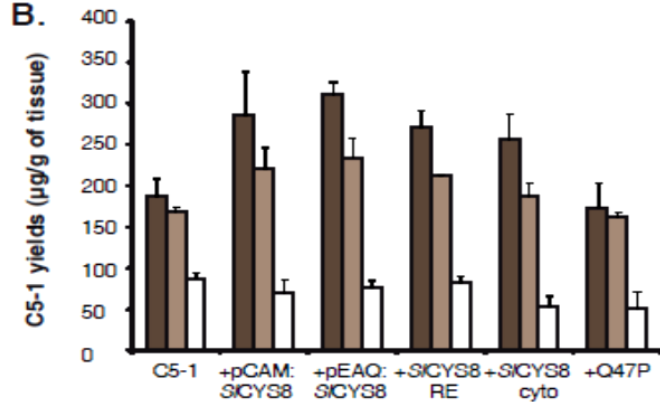
L'anticorps C5-1 a été exprimé dans les feuilles 1, 3 et 5 du *N. benthamiana*, seul ou conjointement avec l'inhibiteur *S/CYS8* sécrété dans l'apoplaste, accumulé dans le cytosol ou retenu dans le RE (**Figure S4.1**). Des essais de co-expression ont aussi été conduits avec le mutant inactif Q47P afin de confirmer que l'effet positif de l'inhibiteur était bien associé à son activité inhibitrice contre des protéases de type cystéine. En bref, aucune différence significative de rendement n'a été observée pour C5-1 co-exprimé avec les versions sécrétée (apoplastique) et 'RE' de *S/CYS8*, suggérant un effet de protection sur l'anticorps recombinant dès son entrée dans le système de sécrétion cellulaire. Aucune différence significative n'a été observée par ailleurs lorsque l'anticorps était exprimé seul, co-exprimé avec *S/CYS8* ciblé dans le cytosol ou co-exprimé avec le mutant Q47P en direction de l'apoplaste (**Figure**

**S4.1B).** Tel qu'observé au chapitre précédent, les niveaux d'anticorps C5-1 et d'inhibiteur *S/CYS8* étaient influencés de façon significative par l'âge des feuilles, présumément en raison d'un taux d'expression moindre dans les feuilles plus âgées (ANOVA,  $P < 0.05$ ; **Figure S4.1B,C**). Ces données confirmaient, dans l'ensemble, un effet protecteur de l'inhibiteur *S/CYS8* lié à son activité inhibitrice contre des protéases de type cystéine retrouvées dans le système de sécrétion cellulaire. Des tests complémentaires ont été conduits pour évaluer le potentiel d'un vecteur d'expression alternatif au vecteur pCAMBIA, le vecteur pEAQ (Sainsbury *et al.*, 2008), qui comporte des séquences régulatrices non codantes du *Cowpea mosaic virus* favorables à une forte expression des transgènes. Des taux d'expression similaires en *S/CYS8* ont été observés dans la feuille 5 pour les deux vecteurs d'expression (**Figure S4.1A**), suggérant un effet négatif généralisé du processus de vieillissement sur l'expression des protéines recombinantes, indépendant du vecteur d'expression utilisé pour les constructions génétiques.

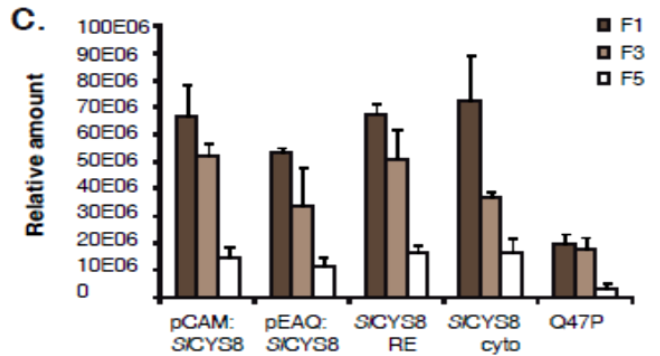
A.



B.



C.



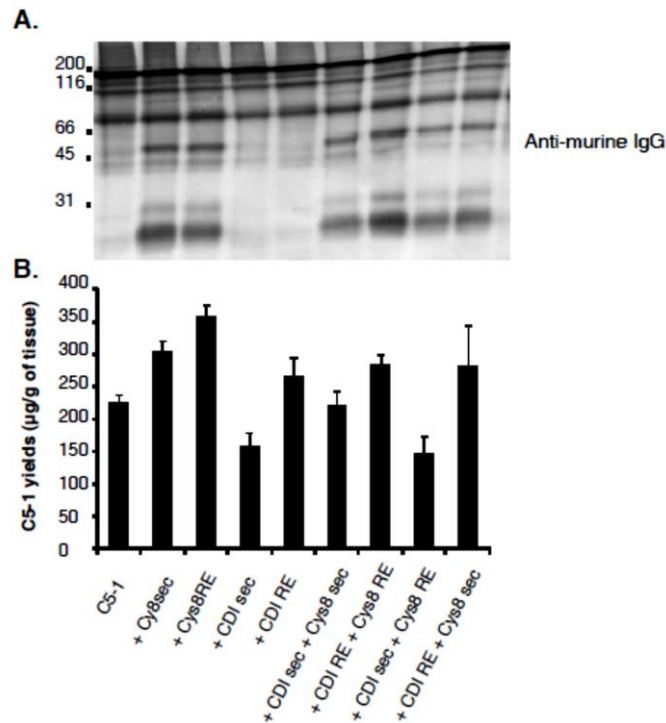
**Figure S4.1** Niveaux d'accumulation d'anticorps C5-1 co-exprimé avec l'inhibiteur SICYS8 ciblé dans différents compartiments cellulaires. A: Les constructions génétiques ont été dessinées de manière à cibler l'inhibiteur dans le réticulum endoplasmique (RE), dans le cytosol (cyto) ou dans l'apoplaste (sec). Les constructions contenaient une version dupliquée du promoteur CaMV 35S (flèche grise), une séquence amplificatrice du *tobacco etch virus* (TEV) pour l'anticorps C5-1, des séquences non traduites de l'ARN du CMPV pour SICYS8 dans le vecteur d'expression pEAO, la séquence codante des protéines d'intérêt (SICYS8, SICDI, Q47P, et/ou les chaînes lourde (H) et légère (L) de C5-1) et/ou les séquences terminatrices du CaMV ou de la nopaline synthase (nos). Les constructions pour la sécrétion de SICYS8 dans l'apoplaste ou sa rétention dans le RE incluait en position 5' la séquence codante du peptide signal d'une *protein disulphide isomerase* (PDI) de la luzerne. Les constructions pour C5-1 et SICDI incluait le peptide signal natif de ces protéines. B: Niveaux d'expression de l'anticorps C5-1 dans les feuilles 1, 3 et 5 du *N. benthamiana*, tels que déterminées par ELISA quantitatif (v. chapitre précédent pour les détails techniques). Chaque donnée en B et C est la moyenne de trois réplicats biologiques  $\pm$  SE. C: Niveaux d'expression de l'inhibiteur SICYS8 dans les feuilles 1, 3 et 5 du *N. benthamiana*, tels qu'estimés par analyse densitométrique des signaux protéiques immunodétectés sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un anticorps anti-SICYS8 (v. chapitre précédent pour les détails techniques). Chaque donnée en B et C est la moyenne de trois réplicats biologiques  $\pm$  SE.

#### 4.1.1.2 L'expression conjointe des inhibiteurs *S/CYS8* et *S/CDI* dans différents compartiments cellulaires n'a pas d'effet additionnel à celui de *S/CYS8* sur la teneur en anticorps C5-1 dans les feuilles

L'anticorps C5-1 a été exprimé seul ou conjointement avec les inhibiteurs *S/CDI* et/ou *S/CYS8* sécrétés dans l'apoplaste ou retenus dans le RE (**Figure S4.2**). En bref, l'expression simultanée des deux inhibiteurs n'a permis aucune protection additionnelle de l'anticorps recombinant comparé à *S/CYS8* exprimé seul. Une baisse de rendement a même été notée lorsque les deux inhibiteurs étaient ciblés dans le même compartiment cellulaire (ANOVA,  $P < 0.05$ , **Figure S4.2B**), et un effet protecteur de *S/CDI* sur C5-1 s'est manifesté dans le RE mais pas dans l'apoplaste, où une baisse de rendement a même été notée ( $P < 0.05$ , **Figure S4.2B**). Différentes hypothèses pourraient expliquer une telle baisse, notamment une pression accrue sur le système de sécrétion durant l'expression de *S/CDI*, qui nuirait à l'expression de l'anticorps C5-1 à l'échelle cellulaire. Il est possible aussi qu'un phénomène de compétition survienne lors de l'expression de plusieurs transgènes d'intérêt, avec pour conséquence un effet différentiel sur l'expression relative de la protéine d'intérêt et des inhibiteurs compagnons. Un tel phénomène d'interférence sur la biosynthèse protéique, observé à quelques reprises avec d'autres protéines recombinantes dans notre laboratoire, pourrait avoir masqué un éventuel effet de protection de *S/CDI* co-exprimé avec l'anticorps C5-1.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Une stratégie de co-expression alternative a été proposée récemment par Sainsbury *et al.* (2013) pour contourner cet effet de compétition apparent observé lorsque plusieurs protéines sont exprimées conjointement. Cette stratégie est basée sur l'expression d'une fusion traductionnelle de la protéine d'intérêt et de l'inhibiteur compagnon, séparés par un lien, ou « linker », peptidique assurant un repliement adéquat des deux partenaires et la stabilité du produit fusionné dans les cellules de la plante hôte. Un manuscrit présenté à l'**Annexe** de la présente thèse décrit les aspects techniques cette nouvelle approche et l'approche plus classique adoptée dans le présent projet (Robert *et al.*, 2015).



**Figure S4.2** Accumulation de l'anticorps C5-1 exprimé seul, avec SICYS8, avec SICDI ou avec les deux inhibiteurs ciblés dans différents compartiments cellulaires dans les feuilles du *N. benthamiana*. A : Patron d'immunodétection de l'anticorps C5-1 exprimé seul ou conjointement avec différentes combinaisons des deux inhibiteurs compagnons. Les protéines foliaires ont été séparées par SDS-PAGE en conditions non réduites, puis l'anticorps recombinant a été détecté sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps anti-IgG de souris (v. chapitre précédent pour la procédure utilisée). Quatre bandes majeures ont été détectées sur gel pour l'anticorps non dénaturé, à des masses moléculaires d'environ 150 (anticorps complet), 120, 100 et 80 kDa. Des bandes additionnelles ont été détectées à environ 90, 50 et 25 kDa en présence de l'inhibiteur SICYS8, tel qu'observé antérieurement par Goulet *et al.* Et au chapitre 3 (2012). B : Teneurs en anticorps C5-1 dans la feuille 3 pour les différentes combinaisons d'anticorps et d'inhibiteurs compagnons. L'anticorps recombinant a été quantifié par ELISA tel que décrit au chapitre précédent. Chaque donnée est la moyenne de trois réplicats biologiques  $\pm$  SE.

#### 4.1.2 En conclusion

En somme, nos travaux sur l'effet protecteur des inhibiteurs de protéases compagnons, s'ils confirment le potentiel de l'approche proposée, illustrent en revanche la grande complexité des phénomènes biologiques sous-jacents à la production de protéines recombinantes et la difficulté d'optimiser ou d'uniformiser les rendements en protéine recombinante sur une base générique. Nos données indiquent clairement qu'une stratégie de protection des protéines recombinantes basée sur la co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons dépend de facteurs multiples, incluant aussi bien le

stade de développement des feuilles et les conditions expérimentales de transfection que l'identité des protéines exprimées et la stratégie de co-expression adoptée au départ.

Des travaux seront nécessaires, dans les années à venir, pour caractériser plus à fond les processus en cause et pour développer des inhibiteurs hybrides n'interférant pas avec la biosynthèse des protéines recombinantes d'intérêt. Il apparaîtra pertinent, en parallèle, d'établir des stratégies d'expression complémentaires pour créer, dans la cellule hôte, des conditions favorables à l'expression et à l'accumulation des protéines d'intérêt en général. Une nouvelle approche est proposée dans ce sens dans les pages suivantes, basée sur l'emploi de MeJA pour une diversion délibérée du métabolisme de défense de la plante hôte favorable à l'expression des protéines recombinantes.



## 4.2 Résumé

Le ratio *protéine recombinante/protéines natives (ou endogènes)* est un facteur clé du rendement et de la qualité des protéines pharmaceutiques dans les bio-usines à protéines végétales. Des procédures ont été mises au point pour enrichir la teneur en protéines recombinantes dans les extraits bruts avant purification, basées sur leurs propriétés physicochimiques spécifiques en comparaison aux protéines de l'hôte. Nous avons testé, dans la présente étude, le potentiel du jasmonate de méthyle (MeJA), un dérivé volatile de l'acide jasmonique, à enrichir la teneur en protéines recombinantes dans les feuilles du *Nicotiana benthamiana*, avant la récolte des tissus et les traitements subséquents d'extraction et de purification. Des études antérieures ont rapporté un réarrangement notable du protéome foliaire chez les plantes via le sentier de l'acide jasmonique, caractérisé par la production de protéines de stress et une forte baisse de la teneur en protéines photosynthétiques, notamment la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO). Tel qu'attendu, des altérations du protéome ont été observées dans les feuilles du *N. benthamiana* sept jours après traitement au MeJA, associées à des niveaux réduits en RuBisCO et à une accumulation de protéines de stress inductibles incluant des inhibiteurs de protéases, des thionines et des chitinases. Une agroinfiltration des feuilles avec des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le transgène a induit une forte accumulation de protéines associées à la pathogenèse six jours après traitement au MeJA, avec une répression presque complète de la surproduction de protéines de stress associées au MeJA. Les niveaux des sous-unités de la RuBisCO ont été partiellement restaurés après agroinfiltration mais la majeure partie de la baisse observée initialement était maintenue après six jours, pour une baisse nette de la teneur en RuBisCO d'environ 50% dans les extraits bruts. Ces changements à l'échelle du protéome étaient associés avec des rendements nets atteignant 425 µg/g de tissu foliaire pour l'anticorps de phénotypage des groupes sanguins C5-1 exprimé dans les feuilles traitées au MeJA, comparé à moins de 200 µg/g dans les feuilles non traitées. Nos données confirment dans l'ensemble le potentiel du MeJA pour l'enrichissement des protéines recombinantes *in planta*, estimé ici pour C5-1 à un taux relatif augmenté de plus de deux fois par rapport aux protéines de l'hôte.

### 4.3 Abstract

A key factor influencing the yield of biopharmaceuticals in plants is the ratio of recombinant to host proteins in crude extracts. Post-extraction procedures have been devised to enrich recombinant proteins before purification. Here we assessed the potential of methyl jasmonate (MeJA) as a generic trigger of recombinant protein enrichment in *Nicotiana benthamiana* leaves before harvesting. Previous studies have reported a significant rebalancing of the leaf proteome via the jasmonate signaling pathway, associated with ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) depletion and the up-regulation of stress-related proteins. As expected, leaf proteome alterations were observed 7 d post-MeJA treatment, associated with lowered RuBisCO pools and the induction of stress-inducible proteins such as protease inhibitors, thionins and chitinases. Leaf infiltration with the *Agrobacterium tumefaciens* bacterial vector 24 h post-MeJA treatment induced a strong accumulation of pathogenesis-related proteins after 6 d, along with a near complete reversal of MeJA-mediated stress protein up-regulations. RuBisCO pools were partly restored upon infiltration but most of the depletion effect observed in non-infiltrated plants was maintained over 6 more days, to give crude protein samples with 50% less RuBisCO than untreated tissue. These changes were associated with net levels reaching 425  $\mu\text{g/g}$  leaf tissue for the blood-typing monoclonal antibody C5-1 expressed in MeJA-treated leaves, compared to less than 200  $\mu\text{g/g}$  in untreated leaves. Our data confirm overall the ability of MeJA to trigger RuBisCO depletion and recombinant protein enrichment in *N. benthamiana* leaves, estimated here for C5-1 at more than 2-fold relative to host proteins.

## 4.4 Introduction

The potential of plants as bio-factories for clinically useful recombinant proteins has been confirmed in recent years with the approval of a first plant-made biopharmaceutical for human therapy, the demonstrated feasibility of readily producing therapeutic antibodies in plants during the recent Ebola virus outbreak, and an increasing number of plant-made proteins undergoing Phase I or Phase II clinical trials (Maxmen, 2012; Merlin *et al.*, 2014; Sack *et al.*, 2015). Plants show several advantages for recombinant protein expression including the ability to perform mammalian-like post-translational maturation of protein backbones, low infrastructure costs compared to classical systems based on industrial-scale fermenters, and no inherent biosafety issues regarding product contamination with microbial toxins or human pathogens (Fischer *et al.*, 2013; Stoger *et al.*, 2014). Much progress has been made over the past decade to decipher basic processes underlying transgene expression in plants, and to develop molecular tools for high yield protein expression in different plant platforms (Streatfield, 2007; Makhzoum *et al.*, 2014). Significant advances have also been made to understand the plant cellular machinery driving protein biosynthesis, maturation and protease processing, useful in designing strategies to modulate these processes and introducing novel cellular functions for recombinant protein design *in planta* (Faye *et al.*, 2005; Benchabane *et al.*, 2008; Gomord *et al.*, 2010; Pillay *et al.*, 2014).

Current research efforts to further establish the potential of plants as suitable protein production hosts include the elaboration of predictive models linking culture conditions and host plant growth parameters with protein expression rate, recovery operations and net protein yield (Buyel and Fischer, 2012; Robert *et al.*, 2013). Current efforts also include the development of customized procedures for an efficient primary recovery and purification of the expressed biopharmaceuticals (reviewed in Wilken and Nikolov, 2012). Plant hosts contain numerous contaminants, including fibers, oils, proteases, phenolics and highly abundant proteins, that must be neutralized or removed from crude samples upon tissue disruption to avoid recombinant protein loss, denaturation or proteolytic processing (Menkhaus *et al.*, 2004; Benchabane *et al.*, 2008). The downstream processing of recombinant proteins, from tissue disruption to the isolation of a suitable purified product, may account for as much as 80% of total production costs and eventually represent a key determinant in the commercial success or failure of any plant-made protein intended for clinical use (Fischer *et al.*, 2012).

An important factor influencing the overall efficiency of downstream processing is the ratio of recombinant to native proteins, which strongly impacts purification yield and contamination of the final product with native proteins or their proteolytic fragments (Wilken and Nikolov, 2012). Significant progress has been made towards the prevention of protein degradation in crude extracts or culture media (Baur *et al.*, 2005; Komarnytsky *et al.*, 2006; Rivard *et al.*, 2006; Benchabane *et al.*, 2009; Huang *et al.*,

2009; Mandal *et al.*, 2014) and towards the optimization of recovery schemes for protein enrichment (e.g. Wilken and Nikolov, 2006; Hassan *et al.*, 2008; Buyel and Fischer, 2014). Approaches to enrich recombinant proteins in plant extracts often rely on the choice of a proper extraction buffer pH or ionic strength, in such a way as to preferentially remove host proteins and facilitate further purification (e.g. Balasubramaniam *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Farinas *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2007; Woodard *et al.*, 2009). Ammonium sulfate precipitation and extraction at low pH are particularly useful in green tissue extracts to precipitate contaminants like cellular debris and photosynthetic pigments. These procedures are also useful to precipitate the highly abundant enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) (Peckham *et al.*, 2006; Woodard *et al.*, 2009; Bendandi *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2010), which represents up to 50% of total soluble proteins (TSP) in leaves (Ellis, 1979) and often complicates the preparation of a highly purified protein product (Gaeda *et al.*, 2007; Ross and Zhang, 2010; Buyel *et al.*, 2013). On the other hand, the use of ammonium sulfate precipitation at large scale remains difficult to implement, and low pH extraction is not compatible with pH-sensitive protein products.

In this study, we explored the potential of methyl jasmonate (MeJA), a volatile derivative of the stress hormone jasmonic acid (Okada *et al.*, 2015), to trigger a generic enrichment of recombinant proteins *in planta*, before tissue harvesting and further processing. Studies have reported strong down-regulating effects for MeJA and jasmonic acid-inducing signals such as wounding, herbivory or insect oral secretions on the transcription of photosynthesis-related genes (Hermsmeier *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2008; Bilgin *et al.*, 2010; Zubo *et al.*, 2011; Duceppe *et al.*, 2012). These suppressing effects of the jasmonic acid signaling pathway are typically associated with a concomitant accumulation of stress-related proteins and carbon-metabolizing enzymes, leading overall to a rebalancing of the host plant's leaf proteome and strongly depleted pools of RuBisCO in leaves (Giri *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009; Duceppe *et al.*, 2012; Ullmann-Zeunert *et al.*, 2013; Mahajan *et al.*, 2014). Here we assessed whether MeJA can reproduce similar proteome alterations in leaves of the protein expression host *Nicotiana benthamiana* (Leuzinger *et al.*, 2013), and whether this could positively impact the specific and relative yields of a mammalian monoclonal antibody, the blood-typing IgG C5-1 (Vézina *et al.*, 2009), transiently expressed in leaf tissue.

## **4.5 Experimental procedures**

### **4.5.1 Plant tissue sampling and elicitor treatments**

Forty-two-day-old *N. benthamiana* plants grown in greenhouse were used for the experiments. Each plant was sprayed evenly with 50 ml of 0.5 mM, 1 mM or 2 mM MeJA in water containing 0.1%

(v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Mississauga ON, Canada) or with 50 ml of 1 mM arachidonic acid (Girard et al., 2007) in the same solvent, transferred to a Conviron growth chamber (Conviron, Winnipeg MB, Canada) and let to incubate for 7 d before leaf tissue harvesting. Plants sprayed with 50 ml of 0.1% (v/v) Triton X-100 in water were used in parallel as negative controls to avoid confounding effects due to experimental conditions. Two or three 1-cm<sup>2</sup> leaf discs were harvested from the third main stem leaf (see Robert et al., 2013) after seven days, as source material for protein and RNA extraction. The leaf samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein or RNA extraction. Three to five biological (plant) replicates were used for each treatment, to allow for statistical treatment of the data.

#### **4.5.2 Gene constructs and leaf agroinfiltration**

Two gene vectors were used for the agroinfiltration assays: an engineered pcambia2300 vector encoding the light and heavy chains of C5-1 fused to an N-terminal signal peptide sequence for cellular secretion (see Goulet et al., 2012 for details on gene construct); and the original ("empty") pcambia2300 binary vector (CAMBIA, Canberra, Australia) as a control for agroinfection. The two binary vectors were electroporated into *A. tumefaciens* strain LBA4404 and the cultures were maintained in lysogeny broth (LB) medium supplemented with 50 µg/ml kanamycin and 50 µg/ml rifampicin. For infiltration, bacteria were grown to stable phase at 28°C to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and collected by centrifugation at 2,000 g. The bacterial pellets were resuspended in 10 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid] (MES) buffer, pH 5.8, containing 100 µM acetosyringone and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Leaf infiltration was performed using a needle-less syringe as described earlier (D'Aoust et al., 2009), after mixing the C5-1 antibody (or empty vector) agrobacterial suspension with an equal volume of bacterial suspension carrying a binary vector for the protein silencing suppressor p19 (Voinnet et al., 2003). Infiltrated tissue for molecular characterization was collected six days post-infection (i.e. seven days post-MeJA or arachidonate treatment), unless otherwise indicated. Three to five biological (plant) replicates were used for each treatment to allow for statistical analyses.

#### **4.5.3 Protein extraction, SDS-PAGE and immunoblotting**

Whole leaf proteins were extracted from three 1-cm<sup>2</sup> leaf discs in 400 µL of ice-cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, by disrupting the leaf samples with tungsten carbide beads (Qiagen, Mississauga ON, Canada) in a Mini-Beadbeater (BioSpec, Bartlesville OK, USA). The complete 'protease inhibitor cocktail' (Roche, Laval QC, Canada) was added in the extraction buffer before tissue disruption as specified by the supplier, except for those extracts dedicated to protease activity monitoring.

Crude leaf extracts were clarified by centrifugation at 20,000 *g* for 30 min at 4°C, and total soluble proteins assayed according to Bradford (1976) with bovine serum albumin as a protein standard (Sigma-Aldrich). Electrophoretic separation of the proteins was performed by 10% (w/v) SDS-PAGE in reducing conditions (Laemmli, 1970), unless otherwise indicated. The resolved proteins were stained with Coomassie blue to visualize protein band patterns or electrotransferred onto nitrocellulose membranes for immunodetection with appropriate primary and secondary antibodies. RuBisCO small subunit was detected using polyclonal IgG raised in rabbit against a synthetic RuBisCO small subunit peptide (Agrisera, Vännäs, Sweden) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG as secondary antibodies (Sigma-Aldrich). RuBisCO large subunit was detected using polyclonal IgG raised in hen against a synthetic RuBisCO large subunit peptide (Agrisera) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-chicken IgG as secondary antibodies (Sigma-Aldrich). The 33-kDa pathogen-inducible PR-2 protein was detected using rabbit polyclonal IgY primary antibodies (Agrisera) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Sigma-Aldrich). C5-1 light and heavy chains were detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich).

#### **4.5.4 Mass Spectrometry**

Leaf proteins for MS identification (corresponding to protein gel areas in boxes A, B and C of Figure 1b) were excised manually from the gels, put in 100  $\mu$ L of Milli-Q water, and sent to the Eastern Québec Proteomics Center (Centre de recherche du CHUL, Québec QC, Canada) for ion trap MS/MS analysis. In-gel protein digestion with sequencing grade trypsin (Promega, Madison WI, U.S.A.) was performed in a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford MA, U.S.A.) according to the provider's instructions. Peptide samples were resolved by online reversed-phase nanoscale capillary liquid chromatography and analyzed by electrospray mass spectrometry using a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher, San Jose CA, U.S.A.). Peptide aliquots of 10  $\mu$ l were loaded onto a 75- $\mu$ m internal diameter BioBasic C18 picofrit column (New Objective, Woburn MA, U.S.A.). The peptides were eluted along a water-acetonitrile/0.1 (v/v) formic acid gradient, at a flow rate of 200 nL/min obtained by flow splitting. Mass spectra were acquired under the data-dependent acquisition mode, using the Xcalibur software, v. 2.0. Each full MS scan (from 400 to 2000 *m/z*) was followed by MS/MS scans of the seven most intense precursor ions using collision-induced dissociation. The relative collisional fragmentation energy was set at 35%, and the dynamic exclusion function enabled with a 30-s exclusion duration.

### 4.5.5 Protein identification

MS/MS spectral data were extracted using the ExtractMSn utility of Thermo's Bioworks application package, with no charge state deconvolution or deisotoping. Protein identities were assessed using the Mascot program, v. 2.3.02 (Matrix Science, London, U.K.) and the Open Source software X! Tandem (Craig *et al.*, 2004). Both softwares were set up to search a custom database containing all known protein sequences of Solanaceae species (Taxonomy ID: 4070, for 39,896 proteins), *A. tumefaciens* protein sequences (12,554 proteins) and data sequences of protein contaminants commonly found in trypsin digests. The database was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. The iodoacetamide derivative of Cys residues was specified in both Mascot and X! Tandem as a fixed modification; citrullination of Arg residues and oxidation of Met residues were specified as variable modifications. MS/MS-based peptide and protein identifications were validated using Scaffold, v. 3.4.9 (Proteome Software, Portland OR, U.S.A.). Identifications were accepted if they included at least five peptides and could be established at greater than 95% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller *et al.*, 2002). Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm as described by Nesvizhskii *et al.* (2003). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS data were grouped to satisfy the principles of parsimony.

### 4.5.6 Real-time RT PCR

mRNA transcripts for C5-1 and *A. tumefaciens* virulence proteins VirB1 and VirE1 were assayed by real-time RT PCR using an ABI PRISM 7500 Fast real-time PCR apparatus, system version 2.0.1 (Applied Biosystems, Carlsbad CA, U.S.A.). Total RNA was extracted from two 1-cm<sup>2</sup> leaf discs collected on the third main stem leaf (Robert *et al.*, 2013) using the Qiagen RNeasy plant mini kit (Qiagen), following the supplier's instructions. RNA samples were treated with DNase I (Roche Diagnostics) to remove contaminant DNA and assessed for quality and quantity using a Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington DE, USA). First-strand cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using 4 units of Omniscript reverse transcriptase (Qiagen) and 1 μM of oligo-dT(15) nucleotides (Roche). PCR mixtures contained 10 μl of Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μl of cDNA template, and 2.5 μl each of appropriate forward and reverse primers at 625 nM final concentration (Table S2). A no-template mixture control was included in each 96-well plate. Amplification rounds consisted of a 20-s denaturation step at 95°C, followed by 40 two-step cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. A dissociation curve analysis was performed after amplification

with the SYBR Green Master Mix, and the cycle threshold of each sample was then compared to a DNA standard curve designed for each pair of primers. Standard curves were generated with 2  $\mu$ l of cDNA template following the NEB Taq polymerase routine protocol (New England Biolabs, Pickering ON, Canada). Amplification products were purified using the Illustra GFX kit (GE Healthcare) and DNA standard curves were devised with serial dilutions of the purified PCR products in nuclease free-water (from  $10^7$  to  $10^2$  copies per  $\mu$ l). Ct data were plotted against the corresponding number of transcript copies. All amplifications were carried out in duplicate.

#### **4.5.7 Bacterial counts**

Bacterial loads in leaves were determined by the counting of colony forming units (CFU) on LB agar plates coated with bacteria recovered at different moments from the third main stem leaf. Each replicate consisted of two 1-cm<sup>2</sup> leaf discs collected 0, 2, 4 or 6 days post-agroinfiltration. The leaf discs were homogenized in 10 mM MES buffer, pH 5.8, containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> in the BioSpec Mini-Beadbeater (*see* Protein extraction, SDS-PAGE and immunoblotting, above). The resulting suspensions were dilution-plated on LB medium supplemented with kanamycin (50 mg/mL) and incubated at 28 °C until CFU counting after two days.

#### **4.5.8 Protease assays**

Protease activities were assayed by the monitoring of substrate hydrolysis progress curves (Goulet *et al.*, 2012) using the following synthetic fluorogenic substrates (Peptides International, Louisville KY, USA): Z-Phe-Arg-methylcoumarin (MCA) for cathepsin L-like C1A Cys proteinases, Z-Arg-MCA for trypsin-like S1 Ser proteinases, and MOCAc-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> for cathepsin D/E-like A1 Asp proteinases. Substrate hydrolysis by the leaf extract proteases (36 ng leaf protein per  $\mu$ L of reaction mixture) were allowed to proceed at 25°C in 50 mM MES, pH 5.8, containing 10 mM L-Cys for the cathepsin L substrate. Protease activity levels were monitored using a Fluostar Galaxy microplate fluorimeter (BMG, Offenburg, Germany) with excitation and emission filters of 360 and 450 nm, respectively, for the MCA substrates, or of 340 and 400 nm, respectively, for the MOCAc substrate. Three independent (biological) replicates were used for each assay.



### 4.5.9 C5-1 quantification

ELISA plates for C5-1 antibody quantification (Becton Dickinson, Mississauga ON, Canada) were coated with 3.75 µg/mL goat anti-mouse heavy chain-specific IgG1 (Sigma-Aldrich) in 50 mM carbonate buffer (pH 9.0) at 4°C for 16-18 h. The plates were washed three times in 10 mM phosphate-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T), blocked through a 1-h incubation at 37°C in 1% (w/v) casein in phosphate-buffered saline (PBS) (Pierce, Rockford IL, USA) and washed three times in PBS-T. A standard curve was generated for each plate with 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 and 60 ng/mL of purified mouse IgG1 (Sigma-Aldrich). All dilutions (controls and samples) were performed in a control extract obtained from leaf tissue infiltrated with a mock inoculum so that any matrix effect was eliminated. The plates were incubated with protein samples for 1 h at 37°C, washed three times in PBS-T and then incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibodies (0.02 µg/mL in blocking solution) (Jackson ImmunoResearch) for 1 h at 37 °C. After additional washes with PBS-T, the plates were incubated with the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine Sure Blue peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg MD, USA). The reaction was stopped by the addition of 1 N HCl and the absorbance read at 450 nm. Three independent (biological) replicates were used for each assay.

### 4.5.10 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SAS program v. 9.1 (SAS Institute, Cary NC, USA). ANOVA and PROC GLM procedures were used to compare C5-1 yields among treatments, densitometry data and protease activities. Contrast calculations were made when the ANOVA was significant using an  $\alpha$  value threshold of 5%. Student t-tests were performed to compare mRNA transcript numbers for *A. tumefaciens* virulence proteins and C5-1 chains in control and MeJA-treated plants.

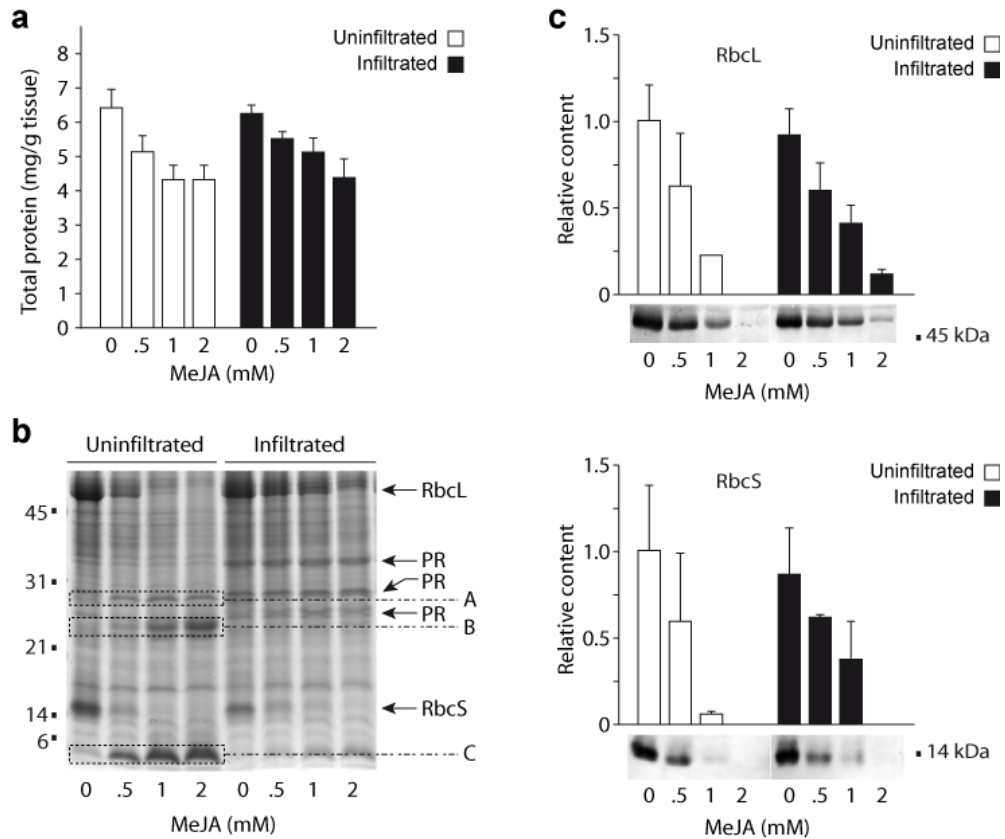
## 4.6 Results and discussion

### 4.6.1 MeJA induces a leaf proteome rebalancing in *N. benthamiana*

Forty-two-day-old *N. benthamiana* plants were treated with 0.5, 1 or 2 mM MeJA to determine the effects of jasmonic acid signaling on the overall protein profile in leaf tissue (Figure 1). On a fresh weight basis, mature leaves of MeJA-treated plants had their TSP contents reduced by 20 to 30% after 7 d

compared to non-treated control leaves, depending on the elicitor dose (ANOVA;  $P < 0.001$ ) (Figure 1a). As observed with other Solanaceae (Lawrence et al., 2008; Duceppe et al., 2012; Ullman-Zeunert et al., 2013), MeJA treatment caused a strong depletion of RuBisCO large and small subunit pools in leaf extracts (Figure 1b), estimated at 40% less than in controls for the 0.5 mM MeJA dose to more than 90% less for the 2 mM dose (ANOVA;  $P < 0.05$  for RbcL;  $P < 0.001$  for RbcS) (Figure 1c). RuBisCO depletion was counterbalanced by the up-regulation of several proteins, notably in the ~30-kDa, ~25-kDa and ~6-kDa molecular mass ranges as visualized on Coomassie blue-stained gels following SDS-PAGE (Figure 1b, boxes A, B and C). A shotgun proteomic analysis was conducted to identify the most abundant proteins in these mass ranges, based on a spectral count analysis of tandem mass spectrometry (MS/MS) peptides obtained from trypsin digests of protein bands in boxes A, B and C of Figure 1b (Table 1). As expected, most identified proteins were typical MeJA-inducible stress-related (or defense) proteins, notably including thionins, chitinases, Ser protease inhibitors of the Kunitz and proteinase inhibitor II protein families, and stress-related enzymes such as superoxide dismutase, carbonic anhydrase and thioredoxin peroxidase (see Table S1 for details on MS/MS peptide sequences).

A number of plants were infiltrated 24 h post-MeJA treatment with *A. tumefaciens* cells harbouring an 'empty' pCAMBIA2300 vector (Goulet et al., 2012), to assess whether MeJA-mediated alterations of the leaf proteome could be maintained over the usual 6 to 7-d period left following bacterial infection for recombinant protein expression (Figure 1). Agroinfiltration was shown previously to trigger the active secretion of PR proteins –mostly PR-2 ( $\beta$ -glucanases) and PR-3 (chitinase) proteins– in the *N. benthamiana* leaf apoplast, presumably involving the pathogen-inducible salicylic acid signaling pathway (Goulet et al., 2010). Accordingly, three protein bands in the mass range of 25 to 33-kDa expected for PR-2 and PR-3 proteins were strongly up-regulated in agroinfiltrated leaves, regardless of the MeJA dose applied (Figure 1b). Not surprisingly given the antagonistic interactions between the jasmonate and salicylate signaling pathways (Derksen et al., 2013), PR protein induction in infiltrated leaves was associated with a strong reversal of the MeJA-mediated stress protein inductions detected in uninfected plants, resulting in faint protein signals in boxes A, B and C 6 d post-infection (Figure 1b). RuBisCO depletion was also tempered in infected leaves, but both the large and small subunits were still found at less than 50% of their original content, relative to untreated plants, in leaves treated with 1 or 2 mM MeJA (Figure 1b,c). Together, these data demonstrate the effectiveness of MeJA as a potent, pre-infection trigger of RuBisCO depletion in *N. benthamiana* leaves, potentially useful in reducing RuBisCO load and increasing recombinant protein relative content in crude protein extracts prior to post-recovery enrichment and purification.



**Figure 4.1** Total soluble proteins (TSP), 1-D proteome profile and RuBisCO subunit levels in agroinfiltrated and control *N. benthamiana* leaves treated with the stress elicitor methyl jasmonate (MeJA) 24 h before infection. (a) TSP on a fresh weight basis in leaves treated with 0, 0.5, 1 or 2 mM MeJA. (b) Coomassie blue-stained protein profile in control and MeJA-treated leaves following SDS-PAGE. Mr, commercial molecular mass markers. PR: pathogenesis-related proteins up-regulated in agroinfiltrated leaves; RbcL and RbcS: RuBisCO large and small subunit, respectively; A, B and C boxes: gel areas containing MeJA-inducible proteins in uninfiltrated plants (see **Table 4.1** for protein identities). (c) Relative amounts of RuBisCO large (RbcL) and small (RbcS) subunits in MeJA-treated leaves as determined by densitometry following immunodetection with appropriate antibodies. Protein signals on the immunoblots were quantified using the Phoretix 2-D Expression software v. 2005 (NonLinear USA, Durham NC, U.S.A.) after scanning of the nitrocellulose membranes with a Microtek ScanMaker II digitalizer (Microtek Laboratory, Torrance CA, U.S.A.). Data are expressed as relative levels compared to non-treated controls assigned an arbitrary level of 1.0. Each bar on panels a and c is the mean of three independent (leaf replicate) values  $\pm$  SE. Infiltrated leaves were transfected with *A. tumefaciens* cells 24 h post-MeJA treatment. All plant samples were harvested seven days post-MeJA treatment (i.e. six days post-agroinfiltration for the transfected plants).

**Table 4.1** Stress-related proteins up-regulated in *N. benthamiana* leaves seven days post-MeJA treatment<sup>1,2</sup>

Protein	Access. No. <sup>3</sup>	Species	No. spectral counts
Box A			
. Acidic endochitinase	P17514	<i>Nicotiana tabacum</i>	34
. Carbonic anhydrase	A4D0J8	<i>Nicotiana benthamiana</i>	30
. Kunitz-type protease inhibitor	A9UF61	<i>Nicotiana glauca</i>	22
. Proteasome subunit $\beta$ type-6	Q9XG77	<i>Nicotiana tabacum</i>	14
. Superoxide dismutase	P22302	<i>Nicotiana glauca</i>	12
. Chaperonin 21	Q9M5A8	<i>Solanum lycopersicum</i>	12
Box B			
. Kunitz-type protease inhibitor	A9UF61	<i>N. glauca</i>	40
. Thioredoxin peroxidase	Q8RVF8	<i>N. tabacum</i>	18
. Pathogenesis-related protein R	P13046	<i>N. tabacum</i>	18
. Proteasome subunit $\beta$ type-6	P93395	<i>N. tabacum</i>	16
. Superoxide dismutase [Fe]	P22302	<i>N. glauca</i>	14
Box C			
. Flower-specific thionin	B2BLV8	<i>N. tabacum</i>	39
. Trypsin proteinase inhibitor	Q1WL50	<i>N. benthamiana</i>	11

<sup>1</sup> These proteins correspond to the most abundant protein species identified by LC-MS/MS in boxes A, B and C of Figure 1b. Proteins identifications based on a minimal spectral count of 10 spectra are included in the list.

<sup>2</sup> Additional information on MS/MS sequences is available in Table S1.

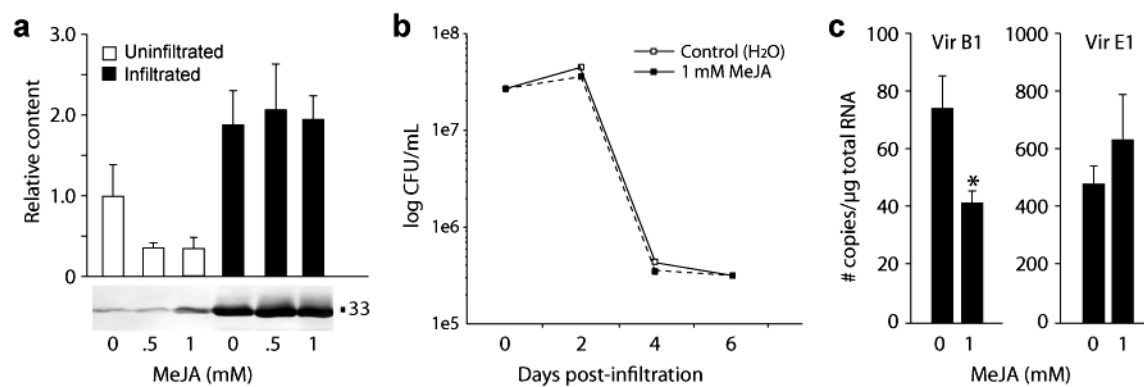
<sup>3</sup> Accession numbers from the National Center for Biotechnology Information/GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 4.6.2 MeJA has little effect on the *N. benthamiana*–*A. tumefaciens* interaction

Data showing a near complete reversal of MeJA up-regulating effects on defense proteins following agroinfiltration suggested a limited influence of jasmonate treatment on both the plant's ability to mount a PR protein-based defense response to bacterial infection, and the eventual ability of the bacterium to transfect plant cells and persist normally into leaf tissue. To further confirm these conclusions we looked closer at the plant–bacterium interaction using immunoblots for PR-2 proteins as a reference for PR protein induction in leaves (Goulet et al., 2010) and mRNA transcript numbers of two agrobacterial virulence genes regulated by salicylate as markers for the transfection process (Yuan et al., 2007) (Figure 2). Several studies have shown strong antagonistic effects for salicylic acid or functional homologues on jasmonate signaling, and divergent regulatory patterns for salicylate-inducible PR proteins and jasmonate-inducible defense proteins upon salicylate or MeJA treatment (Thaler et al., 2012). In line with the Coomassie blue-stained protein profiles above (see Figure 1b), MeJA sprayed at 0.5 or 1 mM had no significant effect on the expression of a constitutively expressed 33-kDa pathogen-inducible PR-2 protein in non-infiltrated leaves (ANOVA;  $P > 0.05$ ) (Figure 2a). In agreement with Goulet et al. (2010) reporting a strong secretion of PR proteins upon agroinfiltration, this protein was strongly up-regulated in agroinfiltrated leaves ( $P < 0.001$ ), independent of the MeJA dose ( $P > 0.05$ ).

Salicylic acid is known to attenuate agroinfection in leaves (Veena et al., 2003; Yuan et al., 2007; Anand et al., 2008) via a downregulation of the bacterium vir regulon affecting virulence gene expression and T-DNA integration into host cells (Yuan et al., 2007). Plants defective in salicylic acid have been shown to be more susceptible to the pathogen, while plants over-producing this metabolite showed increased recalcitrance to infection (Yuan et al., 2007). Bacterial counts and real-time RT PCR assays were here performed to compare *Agrobacterium* cell numbers and mRNA transcript pools of virulence proteins in infiltrated leaves, with or without MeJA treatment, to look for a possible salicylate-repressing effect of the jasmonate derivative facilitating *Agrobacterium* growth and virulence genes expression (Figure 2b,c). Similar numbers of bacteria were retrieved from the apoplast of control and MeJA-treated leaves, as inferred from bacterial counts of 10 to 100 million colony-forming units (CFU) per ml of apoplast extract up to 2 d post-infiltration, to less than a million CFU after 4 or 6 d (Figure 2b). DNA coding sequences for VirB1 and VirE1, two virulence proteins involved in T-DNA translocation into recipient host cells and subsequent integration into the nucleus, respectively (Lacroix et al., 2006), were used as salicylate-responsive bacterial markers for RT PCR assays. VirB1 expression was negatively altered in MeJA-treated leaves and no positive effect on transcription was observed for either gene 7 d post-MeJA treatment despite the natural antagonistic effect of jasmonates on salicylate signaling (Figure

2c). These data confirm overall the onset of a strong defense response to bacterial infection in MeJA-treated and control leaves upon agroinfiltration, and no positive impact of MeJA pre-treatment on both this response and the bacterium's potency for gene transfection.



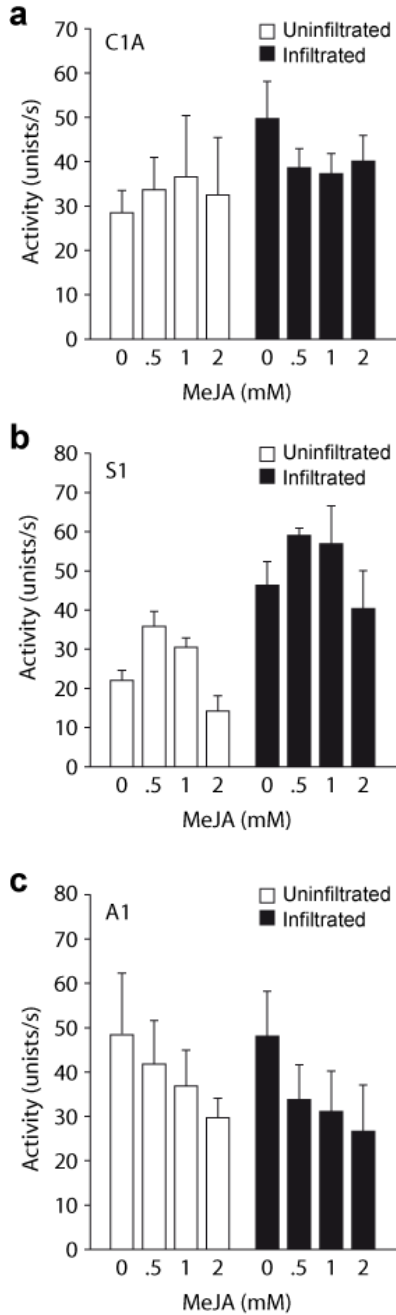
**Figure 4.2** Effect of MeJA treatment on PR-2 accumulation, agrobacteria numbers and/or transcription of the two *A. tumefaciens* virulence proteins VirB1 and VirE1 in *N. benthamiana* leaves. (a) Effects of MeJA treatment on accumulation of the 33-kDa PR-2 protein in control and agroinfiltrated leaves as assayed by densitometry following immunodetected protein band signal. Protein signals on the immunoblots were quantified using the Phoretix 2-D Expression software v. 2005 (NonLinear USA, Durham NC, U.S.A.) after scanning of the nitrocellulose membranes with a Microtek ScanMaker II digitalizer (Microtek Laboratory, Torrance CA, U.S.A.). Data are the mean of three leaf replicates  $\pm$  se. An arbitrary value of 1.0 was assigned to PR-2 level in control healthy leaves. (b) Bacteria retrieved from *N. benthamiana* leaves 0, 2, 4 or 6 days post-agroinfiltration. Data are expressed as log-numbers of colony-forming units (CFU) on agar plates and each point is the mean of five independent (leaf replicate) values  $\pm$  se. (c) mRNA transcript numbers for VirB1 and VirE1 in agroinfiltrated leaves treated with 0 or 1 mM MeJA, as assayed by real-time RT PCR with appropriate DNA primers. Each value is the mean of five biological (leaf replicate) values  $\pm$  se. Asterisk indicates a significantly lower value for VirB1 transcripts in MeJA-treated leaves compared to control leaves (Student's *t*-test;  $P < 0.05$ ).

#### 4.6.3 MeJA also has little effect on protease activities in transfected leaves

Enzymatic assays were carried out with synthetic peptide substrates to investigate the effect of MeJA treatment on protease activity in crude leaf extracts (**Figure 4.3**). Endogenous proteases have a strong impact on recombinant protein yield in plant systems given their direct role in protein turnover either *in planta* during expression or *ex planta* upon tissue disruption for protein recovery (Benchabane *et*

*al.*, 2008). Protease profiles are influenced by different developmental or environmental factors in *N. benthamiana*, including leaf age, agrobacterial infection and recombinant protein expression (Robert *et al.*, 2013). Keeping in mind the complex cross-talks between defense-related signalling pathways (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), the importance of secreted proteases upon pathogenic infection (Hörger and van der Hoorn, 2013; Ramirez *et al.*, 2013; Höwing *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2014) and the MeJA-mediated over-expression of protease inhibitors that could influence the activity of endogenous proteases in crude extracts (*see* **Figure 4.1b** and **Table 4.1**), we here assessed the impact of MeJA treatment on major endoprotease activities in control and agroinfiltrated leaves.

Protease activities measured in crude extracts represent net values reflecting both the relative abundance of protease and protease inhibitor molecules in the extraction medium upon tissue disruption, and the inhibitory specificity of the released inhibitors towards endogenous proteases (Benchabane *et al.*, 2009). Cathepsin L-like Cys protease, trypsin-like Ser protease and cathepsin D/E-like Asp protease activities were assayed in crude extracts of control and MeJA-treated leaves harvested seven days post-MeJA treatment to document the basic long-term effect of jasmonate signalling on leaf protease profiles. The volatile elicitor had no impact on cathepsin L-like activity for the three elicitor doses (ANOVA;  $P > 0.05$ ) (**Figure 4.3a**), while trypsin-like enzymes showed increased activity for the 0.5 and 1 mM doses ( $P < 0.001$ ) (**Figure 4.3b**) despite a concomitant upregulation of Ser protease inhibitors in leaves (*see* **Table 4.1**). By contrast, cathepsin D/E-like activity showed a dose-dependent decrease seven days post-MeJA treatment in uninfiltrated plants ( $P < 0.001$ ), which was also observed in agroinfiltrated leaves (**Figure 4.3c**). As for PR proteins above, cathepsin L-like ( $P < 0.05$ ) and trypsin-like ( $P < 0.001$ ) activities were upregulated in infiltrated leaves six days post-infection, independent of MeJA pre-treatment (**Figure 4.3a,b**). Together, our observations suggest a possible role for Cys and Ser proteases upon bacterial infection and the onset of specific expression patterns for these enzymes in agroinfiltrated leaves, independent of MeJA-mediated protease inhibitor inductions. Our data also point to the establishment of a ‘consolidated’, rebalanced proteome in MeJA-treated leaves 6 d post-infiltration presenting, on one hand, a significantly depleted pool of RuBisCO subunits; and, on the other hand, strongly increased amounts of pathogen-inducible PR proteins apparently substituting depleted pools of MeJA-inducible defense proteins accumulated temporarily in leaves before agroinfiltration.



**Figure 4.3** Major protease activities in crude protein extracts of control and agroinfected *N. benthamiana* leaves treated with 0, 0.5, 1 or 2 mM MeJA 24 h before infiltration. Protease assays were conducted *in vitro* by fluorimetry using synthetic peptide substrates specific to cathepsin L-like (C1A) Cys proteases (a), trypsin-like (S1) Ser proteases (b) and cathepsin D/E-like (A1) Asp proteases (c). Leaf samples were harvested seven days post-MeJA treatment. Each bar is the mean of three independent (leaf replicate) values  $\pm$  SE.



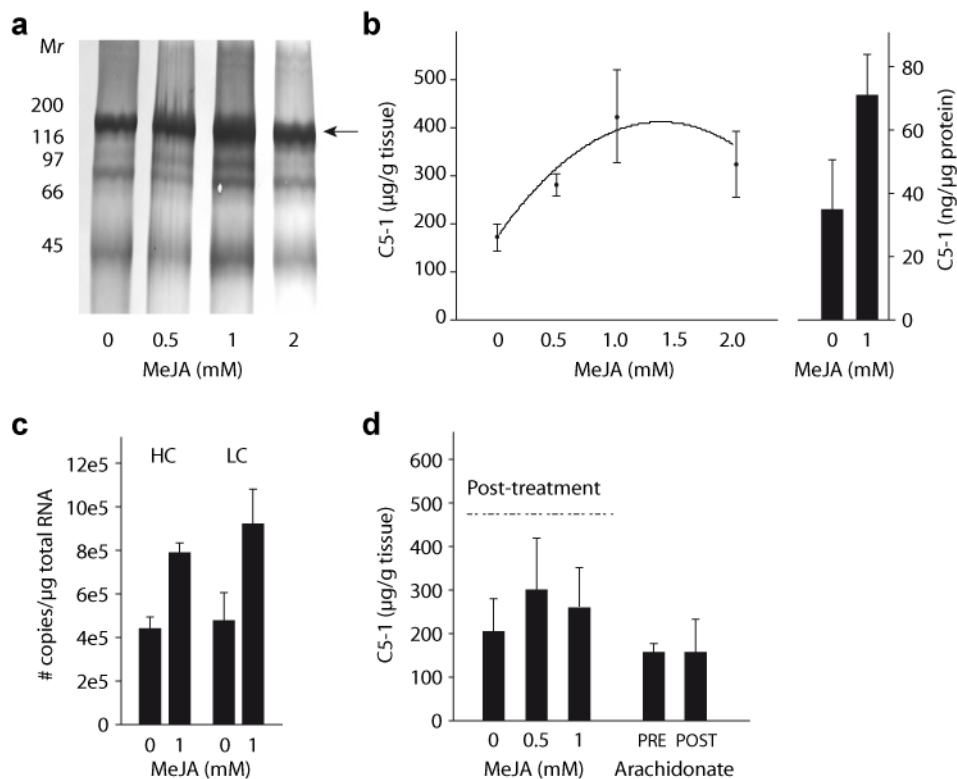
#### 4.6.4 MeJA treatment increases the accumulation of a transiently expressed recombinant protein

Agroinfiltration assays were conducted to determine the impact of MeJA treatment on the expression and steady-state levels of a clinically useful recombinant protein transiently expressed in leaf tissue (**Figure 4.4**). The human blood-typing monoclonal antibody C5-1 (Khouidi *et al.*, 1999) was chosen as a model given the wealth of information available on the expression, maturation and proteolytic processing of this protein in plant systems (Khouidi *et al.*, 1999; Bardor *et al.*, 2003; Sainsbury *et al.*, 2008; Vézina *et al.*, 2009; D'Aoust *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2012; Robert *et al.*, 2013). The light and heavy chains of C5-1 co-expressed in *N. benthamiana* leaves are detected on immunoblots as a high molecular weight, multi-band protein pattern following SDS-PAGE in non-reducing conditions, including a ~150-kDa, fully assembled version of the antibody and a number of smaller yet active fragments (Goulet *et al.*, 2012; Robert *et al.*, 2013). Accordingly, a major protein band of about 150 kDa was immunodetected using anti-IgG primary antibodies, along with the expected smaller bands (**Figure 4.4a**). Visually similar protein band patterns were observed in leaf extracts of MeJA-treated plants compared to control plants, except for the band signals being apparently stronger.

A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to confirm the apparent positive effect of MeJA on antibody accumulation, and to define a possible dose-curve relation for the jasmonate-mediated response (**Figure 4.4b**). Significantly higher amounts of antibody were measured in MeJA-treated leaves, to reach steady-state levels about 1.5 to 2.5 times the levels measured in control plants (ANOVA;  $P < 0.05$ ). The up-regulating effect of MeJA followed a quadratic curve, with a maximum yield value of ~425  $\mu\text{g/g}$  leaf tissue measured at 1 mM MeJA compared to ~325  $\mu\text{g/g}$  leaf tissue at 2 mM MeJA or less than 200  $\mu\text{g/g}$  in control leaves (**Figure 4.4b**). The effect of MeJA was also confirmed on a protein-relative basis to give a net yield of 70 ng antibody/ $\mu\text{g}$  soluble proteins (or ~7% TSP) in leaves treated with 1 mM MeJA, about twice the yield obtained with control leaves ( $P < 0.05$ ) (**Figure 4.4b**). As inferred from real-time RT-PCR data for plants sprayed with 1 mM MeJA, higher C5-1 yields in MeJA-treated leaves were associated with higher numbers of mRNA transcripts for both the light and heavy chains, about twofold the numbers measured in control leaf extracts (**Figure 4.4c**).

Unlike Jung *et al.* (2014) recently reporting increased expression of two plant cell wall-degrading enzymes in detached sunflower leaves infiltrated with a MeJA-supplemented agrobacterial solution, no yield increase was observed when applying MeJA at the moment of infiltration (not shown). Similarly, no yield increase was observed when spraying the same elicitor 24 h post-infiltration (**Figure 4.4d**) or when treating leaves 24 h before infiltration with arachidonic acid, a functional analogue of salicylic acid

(Girard *et al.*, 2007) (**Figure 4.4d**). Induction of the 33-kDa PR-2 protein in leaves transfected with the empty pCAMBIA2300 vector (*see* **Figure 4.2a**) was similar in leaves transfected with the antibody-encoding vector (**Supplementary Figure 4.1**), suggesting a limited, if not null, impact of recombinant antibody expression on the host plant's response to agroinfiltration. Our observations suggest overall the practical usefulness of pre-infiltration MeJA treatment to boost recombinant protein expression in *N. benthamiana* leaves, via a yet to be understood transcription-promoting effect of the jasmonate pathway.



**Figure 4.4** C5-1 recombinant antibody yield and expression in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves treated with 0, 0.5, 1 or 2 mM MeJA. (a) C5-1 heavy and light chain full (arrow) and partial complexes immunodetected following non-reducing SDS-PAGE. Mr, commercial molecular mass markers. (b) ELISA-assayed C5-1 in MeJA-treated leaves. Data are expressed on a weight basis (quadratic curve;  $r^2=0.885$ ) or on a relative basis compared to total soluble proteins. (c) mRNA transcripts for C5-1 light (LC) and heavy (HC) chains in leaves treated with 0 or 1 mM MeJA, as assayed by real-time RT PCR. (d) ELISA-assayed C5-1 in leaves treated with 0, 0.5 or 1 mM MeJA 24 h after agroinfiltration or with 1 mM arachidonic acid 24 h before or after infiltration. Each bar or point on panels b, c and d is the mean of five independent (leaf replicate) values  $\pm$  SE.

## 4.7 Conclusions

Our first goal in this study was to evaluate the potential of MeJA to induce a re-organization, or rebalancing, of the *N. benthamiana* leaf proteome, useful in enriching transiently expressed recombinant proteins *in planta* via a concomitant down-regulation of RuBisCO. Several studies have reported the strong down-regulating impact of jasmonate signalling on RuBisCO expression and accumulation in leaves parallel to the onset of an active defense response involving the biosynthesis of various defensive compounds such as antimicrobial enzymes and antidigestive defense proteins (Bilgin *et al.*, 2010; Duceppe *et al.*, 2012; Ullmann-Zeunert *et al.*, 2013). In line with these reports, MeJA treatment induced a strong depletion of RuBisCO large and small subunit pools in *N. benthamiana* leaves under our experimental conditions, initially compensated by increased levels of jasmonate-inducible defense proteins including thionins, Ser protease inhibitors and antimicrobial hydrolases. The proteome rebalancing effect of MeJA on jasmonate-inducible defense proteins was dramatically compromised by a strong antibacterial response upon agroinfiltration, but the down-regulating effect observed on RuBisCO in non-infiltrated plants was maintained for the most part in infected plants over the usual 6 to 7-d incubation period allocated for protein expression. MeJA treatment generated a RuBisCO-depleted cellular environment in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves, allowing for an effective enrichment of recombinant proteins *in situ*, before their downstream recovery. Compared to non-treated plants, MeJA treatment resulted in an almost fivefold enrichment factor for the transiently expressed C5-1 antibody relative to RuBisCO, derived from a greater than twofold depletion of RuBisCO and by a twofold increase of C5-1 mRNA transcripts leading to a twofold increase in recombinant antibody levels on a fresh weight basis.

The mechanism driving the positive impact of MeJA treatment on C5-1 expression remains to be elucidated, but given the well established constitutive expression pattern of the CaMV 35S viral promoter in plant cells and the negligible impact of MeJA on the ectopic expression of transgenes driven by this promoter (Potenza *et al.*, 2004), the positive effect on transcription is likely to be non-specific. A simple explanation for the improved accumulation of C5-1 on a leaf weight basis would be a low ‘sink pressure’ on amino acid pools towards RuBisCO biosynthesis in RuBisCO-depleted leaves, and a resulting increased availability of metabolite and cellular resources for the production of less abundant (e.g. recombinant) proteins. MeJA was shown recently to promote an elevated expression of ribosomal genes in leaves, presumably useful in keeping the protein biosynthesis machinery active in cells responding to the jasmonate signalling pathway (Noir *et al.*, 2013). This observation, along with recently reported data indicating that nitrogen resources not invested in RuBisCO biosynthesis in RuBisCO-silenced plants are reallocated in part to the expression of other soluble proteins (Stanton *et al.*, 2013), support the idea of a

non-specific, free amino acid pool-related effect for MeJA. Studies have described the positive impact of silencing the expression of highly abundant endogenous proteins to make more amino acids available and to promote recombinant protein deposition in storage organs (Goossens *et al.*, 1999; Schmidt and Herman, 2008; Kim *et al.*, 2012; Shigemitsu *et al.*, 2012). Work is underway to test the hypothesis of a similar non-specific, metabolite resource-related effect of MeJA on CaMV 35S promoter-driven transgenes in *N. benthamiana* leaves. Work is also underway to confirm the general applicability of MeJA as a trigger of recombinant protein enrichment in plant systems, using as models different protein candidates and expression platforms. Questions currently being addressed include the impact of transfection procedures on MeJA-mediated effects, the impact of leaf proteome alterations on yield and maturation of recombinant proteins targeted to different cell locations, and the eventual metabolic interference effects of biologically active proteins expressed in an altered physiological context (Badri *et al.*, 2009).

## 4.8 Acknowledgements

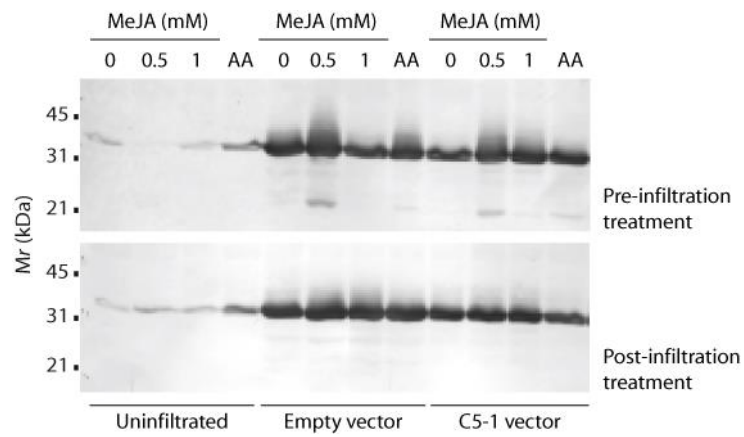
We thank Charles Goulet and Philippe Varennes-Jutras for fruitful discussions while preparing this manuscript and Émilie Desfossés-Foucault for help and useful advice with the qPCR assays. This work was supported by a Discovery grant from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to DM and by an NSERC Strategic grant to DM supported in part by Medicago inc.

## 4.9 Supporting information

**Figure S4.3** Immunodetection of *N. benthamiana* 33-kDa PR-2 protein in crude protein extracts of control and agroinfected leaves treated with 0, 0.5 or 1 mM MeJA, or with 1 mM arachidonic acid (AA), 24 h before (upper panel) or after (lower panel) agroinfiltration.

**Supplementary Table S4.1** Unique matched peptides for stress-regulated proteins up-regulated in *N. benthamiana* leaves 7 days post-MeJA treatment

**Supplementary Table S4.2** Forward and reverse oligonucleotide primers used for real-time RT PCR assays



**Figure S4.3** Immunodetection of *N. benthamiana* 33-kDa PR-2 protein in crude protein extracts of control and agroinfected leaves treated with 0, 0.5 or 1 mM MeJA, or with 1 mM arachidonic acid (AA), 24 h before (upper panel) or after (lower panel) agroinfiltration. *Mr*, commercial molecular mass markers. Agroinfiltrations included treatments with *A. tumefaciens* harbouring either a pcambia2300 'empty vector' or the C5-1-encoding vector.

**Supplementary Table S4.1** Complement to Table 1: Matched unique peptides for stress-regulated proteins up-regulated in *N. benthamiana* leaves 7 d post-MeJA treatment

Protein <sup>1</sup>	Access. No. <sup>2</sup>	Source organism	No. spectra	Matched unique peptides
Box A				
. Acidic endochitinase Q	P17514	<i>Nicotiana tabacum</i>	34	GPIQLTNR GPIQLTNRNNYEK NDAVEDR NDAVEDRIGYYR QGIGSIVTSDLFNEMLK RYCGMLNVAPGENLDCYNQR YCGMLNVAPGENLDCYNQR YYGRGPIQLTNR YYGRGPIQLTNRNNYEK
. Carbonic anhydrase	A4D0J8	<i>Nicotiana benthamiana</i>	30	ALMDLPENGSESTDFIENWVK EIYDKNPELIDELK EIYDKNPELIDELKK FLVFACSDSR IDEITAELQTSGFQSVHPVDR IDEITAELQTSGFQSVHPVDRIK IKTGFDFYFK NIANMVPPYDK NIANMVPPYDKTK TGFDYFK TGFDYFKK VENILVIGHSACGGIK VSPSHVLNFQLGEAFMVR

**Supplementary Table S4.1** Cont'd

Protein	Access. No.	Source organism	No. spectra	Matched unique peptides
Box A (Cont'd)				
. Kunitz-type protease inhibitor	A9UF61	<i>Nicotiana glauca</i>	22	VGDPDLTAR FVTTHSR LCVNQTVWK VGDPDLTARGTR
. Proteasome subunit $\beta$ type-6	Q9XG77	<i>Nicotiana tabacum</i>	14	AAGITSIGVR EQEAINFLEK GKDSVCVVTQK HITIFSPEGR LFQVEYAFK LLDQTSVSHLPITK NEAAEFR TLVQQR VLTTEEIDEHLTAISERD YLGLLATGMTADAR
. Superoxide dismutase	P22302	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	12	AAAATQFGSGWAWLAYKPEEK AAAATQFGSGWAWLAYKPEEK AYVDNLNK AYVDNLNKQIDGTELDGK DFGSYDAFVK DFGSYDAFVKEFK KFELQPPYPMDALEPHMSSR LVSWEAVSSR QIDGTELDGK QIDGTELDGKTLEDIILVTYNK RPDYISIFMEK TLEDIILVTYNK

**Supplementary Table S4.1** Cont'd

Protein	Access. No.	Source organism	No. spectra	Matched unique peptides
Box A (Cont'd)				
. Chaperonin 21	Q9M5A8	<i>Solanum lycopersicum</i>	12	GADGSDYITLR KPLSVSPGNTVLYSK TAGGLLLTEAAK TGAQVIYSK TKVDISVK VAEAEKTAGGLLLTEAAK VLIKVAEAEK YAGSEFKGADGSDYITLR YAGTEVEFDGSK YTTLKPLGDR
Box B				
. Kunitz-type protease inhibitor	A9UF61	<i>N. alata</i>	40	VGDPDLTAR FVTTHSR LCVNQTVWK VGDPDLTARGTR
. Thioredoxin peroxidase	Q8RVF8	<i>N. tabacum</i>	18	GLFIIDKEGVQIHSTINNLGIGR GSKEYFASI KSGGLGDLNYPLISDVTK LSEYIGK SGGLGDLNYPLISDVTK SVDETLR SYNVLIPDQGIALR TLQALQYVQDNPDEVCPAGWKPGEK



**Supplementary Table S4.1** Cont'd

Protein	Access. No.	Source organism	No. spectra	Matched unique peptides
Box B (Cont'd)				
. Pathogenesis-related protein R	P13046	<i>N. tabacum</i>	18	CPDAYSYPQDDPTSLFTCPSGTNYR TNCNFDGSGR TNEYCCTNGPGSCGPTDLSR TQGGCNPCTVIK
. Proteasome subunit $\beta$ type-6	P93395	<i>N. tabacum</i>	16	DGASGGVVR SGSAADSQIVSDYVR TSTGMYVANR YFLHQHTIQLGQPATVK
. Superoxide dismutase [Fe]	P22302	<i>N. plumbaginifolia</i>	14	AAAATQFGSGWAWLAYKPEEK AYVDNLNK AYVDNLNKQIDGTELDGK DFGSYDAFVK DFGSYDAFVKEFK KFELQPPYPMDALEPHMSSR LVSWEAVSSR QIDGTELDGK QIDGTELDGKTLEDIILVTYNK RPDYISIFMEK TLEDIILVTYNK

**Supplementary Table S4.1** Cont'd

Protein	Access. No.	Source organism	No. spectra	Matched unique peptides
Box C				
. Flower-specific thionin	B2BLV8	<i>N. tabacum</i>	39	ACISEKFTDGHCSK FTDGHCSK KACISEK KACISEKFTDGHCSK ACISEKFTDGHCSK ACISEK
. Trypsin proteinase inhibitor	Q1WL50	<i>N. benthamiana</i>	11	GCTFEC DPR ICTNCCAGK LCTNCCAGTK NRLCTNCCAGTK YFSDDGTFVCEGES DPR YFSDDGTFVCEGES DPRNPK YFSDDGTFVCEGES DPRNPKPCPR IAYGICPLS IAYGVCPR

<sup>1</sup> These proteins correspond to the most abundant protein species identified by LC-MS/MS in boxes A, B and C of Figure 1b.

<sup>2</sup> Accession numbers from the National Center for Biotechnology Information/GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Supplementary Table S4.2** Forward and reverse oligonucleotide primers used for real-time RT PCR assays

Gene (protein)	Forward	Reverse	Annealing temperature (°C)	Amplicon (bp)
. C5-1 antibody heavy chain	CCAAAACGACACCCCATCT	AGGTCACTGTCCTGGCTCA	60.5	120
. C5-1 antibody light chain	ATCCCCTCCAGGTTCAAGTGG	CGTGAGAGGCCAGCTGTTAC	60.8	120
. <i>A. tumefaciens</i> VirB1	ACGAGGCGCTAAAATCCGAA	GATTTGCCGTTGTCCTGGTG	60.0	121
. <i>A. tumefaciens</i> VirE1	GCCGATAGAGAGACCGGAGT	AGATTGTCTTCTGGGAGCGG	60.0	135



# **Chapitre 5**

## **Conclusions et perspectives**



## 5.1. Retour sur les hypothèses

L'expression transitoire de transgènes dans les plantes est un moyen rapide et sécuritaire pour la production de protéines recombinantes d'intérêt médical. Malgré des progrès rapides ayant permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation des protéines et de développer des outils d'expression adaptés à la moléculaire végétale (Gomord and Faye, 2004; Potenza *et al.*, 2004; Faye *et al.*, 2005; Streatfield, 2007), beaucoup reste à faire pour uniformiser les rendements et optimiser la qualité des protéines exprimées. Des travaux demeurent nécessaires, par exemple, pour une meilleure caractérisation et un meilleur contrôle des protéases endogènes de la plante, qui sont responsables d'une dégradation parfois importante des protéines étrangères et qui ont un influence aussi bien sur la quantité que sur la qualité des produits recombinants obtenus.

Une étude antérieure dans notre laboratoire avait montré qu'il est possible de protéger une protéine recombinante *in planta* en co-exprimant des inhibiteurs de protéases recombinants (Goulet *et al.*, 2012). Ces travaux démontraient qu'il était envisageable de manipuler le métabolisme de la plante hôte pour protéger les produits recombinants exprimés, avant même leur extraction à partir des tissus producteurs. Il a souvent été suggéré que la physiologie de la plante ou son système de défense pouvaient influencer les rendements en protéine recombinante en affectant, entre autres, l'activité des protéases résidentes. Il apparaissait pertinent, à l'initiation de ce projet, d'établir si, et de mieux comprendre comment, différents aspects de la physiologie de la plante hôte, liés en l'occurrence aux organes foliaires du *N. benthamiana*, pouvaient jouer un rôle sur la production et la qualité des protéines recombinantes exprimées.

Un objectif central du projet était d'établir dans quelle mesure le stade de développement des feuilles influençait les rendements en protéine recombinante. Un autre objectif était d'évaluer le potentiel d'une manipulation délibérée du métabolisme de défense sur l'accumulation relative des protéines endogènes et recombinantes dans la plante, avec comme cible d'induction le sentier du jasmonate, un sentier de défense antagoniste au sentier de l'acide salicylique pouvant éventuellement interférer avec les réponses de la plante hôte à l'agroinfection.

### 5.1.1 Hypothèse principale 1, sur l'influence du stade de développement des feuilles sur le rendement en anticorps C5-1

Nous avons dans un premier temps caractérisé quelques attributs des tissus foliaires de la plante hôte, considérée ici en tant que bio-usine à protéines. Nous avons étudié, en particulier, l'évolution de la concentration en protéines solubles dans les feuilles en fonction de leur âge, de même que leur masse et leur densité pondérale, de manière à établir des balises pour l'interprétation de leur importance relative sur le plan du rendement à l'échelle de la plante. Pendant la sénescence, la concentration en protéines diminue dans les feuilles alors que les ressources en métabolites sont redistribuées aux tissus plus jeunes (Lim *et al.*, 2007). Très peu d'études avaient considéré formellement, encore, l'impact du vieillissement des feuilles sur la production transitoire de protéines recombinantes. En bref, nos données ont montré que le rendement en anticorps C5-1, notre protéine modèle pour ce projet, variait bel et bien en fonction de l'âge des feuilles. Tel qu'attendu, les rendements en C5-1 ont été moindres dans les feuilles plus âgées, où la sénescence était entamée. Les feuilles les plus volumineuses sur la tige principale, parvenues à maturité mais toujours très actives sur le plan métabolique, étaient aussi les plus aptes à produire de la biomasse et les plus déterminantes pour le rendement global en anticorps à l'échelle de la plante.

Nous avons caractérisé en parallèle l'activité des protéases dans les feuilles, nous attardant en particulier aux protéases de type cystéine de la famille des cathepsines L et aux protéases de type aspartate de la famille des cathepsines D/E, qui représentent une part importante des protéases totales. En bref, nous avons établi que l'activité des cathepsines L augmentait dans les feuilles en cours de développement, indépendamment du processus d'agroinfiltration, alors qu'elle diminuait dans l'apoplaste après infiltration. En comparaison, les activités de type aspartate diminuaient suite à l'agroinfiltration aussi bien dans les cellules qu'à l'extérieur dans le milieu apoplastique. Ces résultats nous permettaient de mieux connaître la distribution des activités protéasiques au cours du développement dans la plante hôte, et de cerner dans quelle mesure le processus d'agroinfiltration pouvait influencer cette distribution. Nos données laissaient présager, dans l'ensemble, un impact négatif éventuel des protéases endogènes de type cystéine sur le rendement de protéines recombinantes comme l'anticorps C5-1.

Sur cette base, et pour limiter l'incidence des activités de type cystéine *in planta*, nous avons co-exprimé C5-1 avec la cystatine de tomate *SICYS8*, un inhibiteur de protéases de la famille des cystatines. En accord avec Goulet *et al.* (2012), cette opération a eu pour résultat une hausse du rendement en anticorps dans les jeunes feuilles et dans celles parvenues à maturité. En revanche, aucune augmentation de rendement n'a été observée dans les feuilles plus âgées, dans lesquelles *SICYS8* s'exprimait très faiblement. Pour sa part, l'expression d'un inhibiteur de type aspartate, l'inhibiteur *SICDI*, n'a pas permis



d'augmenter les teneurs en C5-1, conduisant même à une baisse de rendement dans les jeunes feuilles. Ces résultats, bien qu'indicateurs du potentiel des inhibiteurs compagnons, soulignaient clairement la grande complexité des processus cellulaires sous-jacents à leur effet protecteur dans la plante, liée non seulement à la nature des séquences géniques intégrées mais aussi à leur efficacité variable dans les différents organes de l'hôte végétal.

Comme pour de nombreuses protéines endogènes, les taux d'expression des inhibiteurs et de l'anticorps recombinants diminuaient dans les tissus plus âgés. Les transgènes utilisés étant placés sous le contrôle d'un promoteur constitutif, l'expression des différentes protéines recombinantes n'était pas, selon toute vraisemblance, affectée par des voies de contrôle spécifiques mais plutôt d'une manière non spécifique associée à l'état métabolique général des tissus producteurs. Dans les feuilles plus âgées, les inhibiteurs exprimés se sont accumulés à des taux très faibles alors que les teneurs en protéases augmentaient en parallèle, générant ainsi un ratio *inhibiteur/protéases* insuffisant pour assurer une protection mesurable de l'anticorps C5-1. L'importance d'un ratio *inhibiteur/protéases* élevé pour une accumulation facilitée de la protéine d'intérêt dans le tissu foliaire était d'ailleurs suggérée par des tests d'expression dans les jeunes feuilles, qui montraient qu'un taux d'expression soutenu de l'inhibiteur *S/CYS8* permettait une accumulation effective de l'anticorps C5-1 sur une période dépassant de plusieurs jours la durée habituelle de six jours pour l'obtention d'un pic de production maximal. Ces résultats appuyaient, en somme, l'idée selon laquelle le maintien d'un taux d'expression satisfaisant de la cystatine *S/CYS8* pouvait permettre, du moins en théorie, une protection et une accumulation accrues de l'anticorps C5-1 dans les feuilles plus âgées, dans la mesure évidemment où les transgènes correspondants s'y exprimeraient de façon notable.

### **5.1.2 Hypothèse principale 2, sur l'influence des sentiers de défense de la plante hôte sur le rendement en anticorps C5-1**

Une conclusion importante des résultats de la première partie du projet était que le rendement en anticorps C5-1 et l'effet de protection exercé par l'inhibiteur *S/CYS8* dépendaient directement du taux d'expression et du turnover des deux protéines, déterminés pour leur part par l'âge des feuilles, l'efficacité du système de biosynthèse protéique et la mise en place de systèmes protéolytiques potentiellement incompatibles avec l'accumulation d'une protéine recombinante. En complément à cette partie des travaux, nous avons évalué l'effet combiné des inhibiteurs *S/CDI* et *S/CYS8* ciblés dans différents compartiments cellulaires, dans le but d'évaluer l'utilité possible d'une inhibition plus étendue des protéases endogènes sur les taux d'expression de ces deux protéines et de l'anticorps C5-1. Aucun effet de

protection complémentaire à l'effet protecteur observé avec l'inhibiteur *S/CYS8* exprimé seul n'a pu être détecté et des réponses imprévisibles, y compris des baisses de rendement, ont été observées dans certains cas. En définitive, si nos données confirmaient à priori le potentiel protecteur des inhibiteurs de protéases compagnons chez *N. benthamiana*, elles mettaient aussi en évidence la somme de travaux encore nécessaires pour une optimisation de cette approche dans un contexte de production impliquant un hôte végétal complexe. Nos données soulignaient en outre la pertinence de développer des approches complémentaires pour l'optimisation du rendement, basées sur une prise en compte attentive et un contrôle éventuel du métabolisme de la plante hôte en lien avec la biosynthèse des protéines.

Dans cette optique, nous nous sommes attardés en seconde partie de projet à la question du rendement relatif en produit protéique recombinant, défini simplement comme la teneur relative en protéine recombinante dans les tissus producteurs au moment de la récolte. Le rendement net finalement obtenu en produit recombinant, au terme des processus d'expression, d'extraction et de purification, est fortement tributaire du ratio *protéine recombinante/protéines natives* (Wilken et Nikolov, 2012). Nous avons tenté, à la première étape du projet, d'augmenter ce ratio en accroissant la quantité brute d'anticorps accumulé par une co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons pour assurer sa protection post-synthèse. Nous nous sommes attardés, en seconde partie de projet, à l'autre terme de l'équation, à savoir la teneur en protéines natives dans les extraits protéiques foliaires post-extraction. L'objectif était, pour ces travaux, de dériver le métabolisme cellulaire de la plante hôte en direction du système de défense dépendant du jasmonate, de manière à « rebalancer » le ratio *protéine recombinante/protéines natives* en faveur de l'anticorps C5-1. Sur le plan biochimique, l'objectif était, d'une part, d'induire dans les feuilles une baisse de la teneur en RuBisCO, un contaminant majeur des extraits protéiques végétaux; et d'autre part, de libérer des ressources en acides aminés pour la synthèse de protéines alternatives, notamment l'anticorps C5-1. Nous posons l'hypothèse qu'une baisse effective de la teneur en RuBisCO allait mener à une diminution de la teneur en protéines contaminantes et à un enrichissement *de facto* de la teneur en protéines recombinantes dans les feuilles, favorable à l'obtention subséquente d'un rendement accru en produit protéique de haute qualité.

Nous avons utilisé pour ces travaux un dérivé volatil de l'acide jasmonique, le MeJA, souvent utilisé comme activateur exogène du sentier du jasmonate. Ce sentier de défense induit dans les feuilles une inhibition marquée de l'expression des gènes associés à la photosynthèse, notamment ceux de la RuBisCO, en plus d'induire la production d'une gamme de protéines de stress incluant des inhibiteurs de protéases (Hermsmeier *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2008; Bilgin *et al.*, 2010; Duceppe *et al.*, 2012). En accord avec ces études, un traitement des plantes au MeJA a induit une réorganisation notable du protéome foliaire de l'hôte modèle, caractérisée tel qu'attendu par l'induction de protéines de défense et

des teneurs diminuées en sous-unités de la RuBisCO. L'effet activateur du MeJA sur les protéines de stress s'est avéré être presque entièrement renversé dans les plantes agroinfiltrées, mais la baisse observée en RuBisCO était toujours de presque 50% au terme de la période de six jours allouée à l'expression de la protéine recombinante.

Le traitement des plantes au MeJA, en plus de ne pas affecter le processus d'agroinfection et de ne pas montrer d'effet notable sur la teneur en activités protéasiques endogènes, a permis une augmentation marquée du rendement en C5-1 dans les feuilles, expliqué en bonne partie par un taux d'expression accru des transgènes des chaînes lourde et légère comparé aux taux mesurés dans les plantes non traitées avec l'éliciteur. Ces observations suggéraient dans l'ensemble que l'effet positif du MeJA sur la teneur en C5-1 était lié à l'établissement d'un milieu cellulaire favorable à l'expression des transgènes, présumément caractérisé par une disponibilité accrue en acides aminés libres (Ullmann-Zeunert *et al.*, 2013; Stanton *et al.*, 2013) et un système de traduction protéique préservé dans les tissus foliaires (Noir *et al.*, 2013).

## 5.2. En conclusion

En bref, le présent projet de recherche a permis de confirmer l'influence marquée de l'état physiologique des tissus de la plante hôte sur le rendement global en protéine recombinante. L'étendue et l'importance de ce facteur sur le rendement final dépendra à terme des caractéristiques de chaque protéine exprimée, et des travaux demeurent essentiels pour améliorer notre compréhension des systèmes en cause et assurer l'obtention de rendements satisfaisants en produits recombinants de qualité. Deux approches ont été considérées au cours du projet pour accroître le rendement en anticorps C5-1 basées, d'une part, sur la co-expression d'inhibiteurs de protéases compagnons et, d'autre part, sur l'effet 'anti-RuBisCO' du MeJA. Il sera pertinent dans les années à venir d'évaluer la complémentarité des deux approches, considérant leurs modes d'action distincts et l'impact négligeable du MeJA sur les activités protéasiques de type cystéine dans les feuilles agroinfiltrées du *N. benthamiana*. Il sera intéressant par ailleurs de mettre au point des inhibiteurs de protéases compagnons multifonctionnels à taux d'expression optimisés ou dirigés contre des protéases identifiées comme étant problématiques dans un contexte de moléculture. Un article récent de notre groupe de recherche décrivait par exemple le design d'inhibiteurs hybrides pour l'expression efficace d' $\alpha_1$ -antichymotrypsine humaine dans les feuilles du *N. benthamiana* (Sainsbury *et al.*, 2013; v. aussi Robert *et al.*, 2015 à l'Annexe 1 du présent document). Une fusion traductionnelle intégrant au sein d'un polypeptide unique l'inhibiteur *SICYS8* et la protéine humaine permettait dans ce cas de tirer avantage de l'effet stabilisateur de *SICYS8* tout en évitant le problème de compétition observé en co-exprimant les deux protéines séparément.



## Références

- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y.H. and Mysore, K.S. (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* **146**, 703-715.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R. and Menegatti, E. (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* **4**, 231-251.
- Badri, M.A., Rivard, D., Coenen, K. and Michaud, D. (2009) Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins: the case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* **9**, 746-756.
- Badri, M.A., Rivard, D., Coenen, K., Vaillancourt, L.P., Goulet, C. and Michaud, D. (2009) A SELDI-TOF MS procedure for the detection, quantitation, and preliminary characterization of low-molecular-weight recombinant proteins expressed in transgenic plants. *Proteomics* **9**, 233-241.
- Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., Van Cott, K. and Zhang, C. (2003) Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *J Chromatogr A* **989**, 119-129.
- Bally, J., Nadai, M., Vitel, M., Rolland, A., Dumain, R. and Dubald, M. (2009) Plant physiological adaptations to the massive foreign protein synthesis occurring in recombinant chloroplasts. *Plant Physiol* **150**, 1474-1481.
- Bardor, M., Loutelier-Bourhis, C., Paccalet, T., Cosette, P., Fitchette, A.C., Vezina, L.P., Trepanier, S., Dargis, M., Lemieux, R., Lange, C., Faye, L. and Lerouge, P. (2003) Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is homogenous and suitable for glyco-engineering into human-compatible structures. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 451-462.
- Baur, A., Reski, R. and Gorr, G. (2005) Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol J* **3**, 331-340.
- Beers, E.P., Jones, A.M. and Dickerman, A.W. (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**, 43-58.

- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P. and Delledonne, M. (2003) AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem* **270**, 2593-2604.
- Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V. and Michaud, D. (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* **6**, 633-648.
- Benchabane, M., Goulet, M.C., Dallaire, C., Cote, P.L. and Michaud, D. (2008) Hybrid protease inhibitors for pest and pathogen control--a functional cost for the fusion partners? *Plant Physiol Biochem* **46**, 701-708.
- Benchabane, M., Rivard, D., Girard, C. and Michaud, D. (2009) Companion protease inhibitors to protect recombinant proteins in transgenic plant extracts. *Methods Mol Biol* **483**, 265-273.
- Benchabane, M., Saint-Jore-Dupas, C., Bardor, M., Faye, L., Michaud, D. and Gomord, V. (2009) Targeting and post-translational processing of human alpha1-antichymotrypsin in BY-2 tobacco cultured cells. *Plant Biotechnol J* **7**, 146-160.
- Benchabane, M., Saint-Jore-Dupas, C., Faye, L., Gomord, V. and Michaud, D. (2009) Nucleocytoplasmic transit of human alpha1-antichymotrypsin in tobacco leaf epidermal cells. *Plant Biotechnol J* **7**, 161-171.
- Benchabane, M., Schluter, U., Vorster, J., Goulet, M.C. and Michaud, D. (2010) Plant cystatins. *Biochimie* **92**, 1657-1666.
- Bendandi, M., Marillonnet, S., Kandzia, R., Thieme, F., Nickstadt, A., Herz, S., Frode, R., Inoges, S., Lopez-Diaz de Cerio, A., Soria, E., Villanueva, H., Vancanneyt, G., McCormick, A., Tuse, D., Lenz, J., Butler-Ransohoff, J.E., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2010) Rapid, high-yield production in plants of individualized idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* **21**, 2420-2427.
- Berlec, A. and Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**, 257-274.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R. and DeLucia, E.H. (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ* **33**, 1597-1613.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt Biochem* **72**, 248-254.

Brunelle, F., Girard, C., Cloutier, C. and Michaud, D. (2005) A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. *Arch Insect Biochem* **60**, 20-31.

Buyel, J.F., Bautista, J.A., Fischer, R. and Yusibov, V.M. (2012) Extraction, purification and characterization of the plant-produced HPV16 subunit vaccine candidate E7 GGG. *J Chromatogr B* **880**, 19-26.

Buyel, J.F. and Fischer, R. (2012) Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnol Bioeng* **109**, 2575-2588.

Buyel, J.F. and Fischer, R. (2014) Flocculation increases the efficacy of depth filtration during the downstream processing of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco. *Plant Biotechnol J* **12**, 240-252.

Buyel, J.F., Woo, J.A., Cramer, S.M. and Fischer, R. (2013) The use of quantitative structure-activity relationship models to develop optimized processes for the removal of tobacco host cell proteins during biopharmaceutical production. *J Chromatogr A* **1322**, 18-28.

Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5**, 2497-2507.

Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 45-66.

Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K. and Dent, M. (2013) Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med* **1**(1), 103.

Chen, R. (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv* **30**, 1102-1107.

Chen, Y., Pang, Q., Dai, S., Wang, Y., Chen, S. and Yan, X. (2011) Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *J Plant Physiol* **168**, 995-1008.

Choi, J., Diao, H., Feng, Z.C., Lau, A., Wang, R., Jevnikar, A.M. and Ma, S. (2014) A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. *Plant Biotechnol J* **12**, 425-435.

Conley, A.J., Zhu, H., Le, L.C., Jevnikar, A.M., Lee, B.H., Brandle, J.E. and Menassa, R. (2011) Recombinant protein production in a variety of Nicotiana hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnol J* **9**, 434-444.

Craig, R., Cortens, J.P. and Beavis, R.C. (2004) Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J Proteome Res* **3**, 1234-1242.

Daniell, H., Streatfield, S.J. and Wycoff, K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* **6**, 219-226.

D'Aoust, M.A., Couture, M.M., Charland, N., Trepanier, S., Landry, N., Ors, F. and Vezina, L.P. (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J* **8**, 607-619.

D'Aoust, M.A., Lavoie, P.O., Belles-Isles, J., Bechtold, N., Martel, M. and Vezina, L.P. (2009) Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Methods Mol Biol* **483**, 41-50.

D'Aoust, M.A., Lavoie, P.O., Couture, M.M., Trepanier, S., Guay, J.M., Dargis, M., Mongrand, S., Landry, N., Ward, B.J. and Vezina, L.P. (2008) Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol J* **6**, 930-940.

Das, A., Lee, S.H., Hyun, T.K., Kim, S.W. and Kim, J.Y. (2013) Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnol Rep* **7**, 9-26.

Datta, P., Linhardt, R.J. and Sharfstein, S.T. (2013) An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol Bioeng* **110**, 1255-1271.

Davies, H.M. (2010) Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects. *Plant Biotechnol J* **8**, 845-861.

De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., De Wilde, C., Jacobs, A., Kapila, J., Angenon, G., Van Montagu, M., Gerats, T. and Depicker, A. (1999) High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *Eur J Biochem* **259**, 426-434.



- De Muynck, B., Navarre, C. and Boutry, M. (2010) Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol J* **8**, 529-563.
- Derksen, H., Rampitsch, C. and Daayf, F. (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci* **207**, 79-87.
- Doran, P.M. (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* **24**, 426-432.
- Drakakaki, G., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Gonzalez-Melendi, P., Fischer, R., Christou, P. and Stoger, E. (2006) The intracellular fate of a recombinant protein is tissue dependent. *Plant Physiol* **141**, 578-586.
- Drake, P.M., Chargelegue, D.M., Vine, N.D., van Dolleweerd, C.J., Obregon, P. and Ma, J.K. (2003) Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol Biol* **52**, 233-241.
- Drugmand, J.C., Schneider, Y.J. and Agathos, S.N. (2012) Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnol Adv* **30**, 1140-1157.
- Duceppe, M.O., Cloutier, C. and Michaud, D. (2012) Wounding, insect chewing and phloem sap feeding differentially alter the leaf proteome of potato, *Solanum tuberosum* L. *Proteome Sci* **10**, 73.
- Ellis, R.J. (1979) Most Abundant Protein in the World. *Trends Biochem Sci* **4**, 241-244.
- Farinas, C.S., Leite, A. and Miranda, E.A. (2005) Aqueous extraction of recombinant human proinsulin from transgenic maize endosperm. *Biotechnol Prog* **21**, 1466-1471.
- Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V. and Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**, 1770-1778.
- Faye, L., Lerouge, P. and Gomord, V. (2002) [GMOs and production of pharmaceutical molecules]. *Bull Acad Natl Med* **186**, 1411-1425.
- Figueiredo, A., Monteiro, F. and Sebastiana, M. (2014) Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Front Plant Sci* **5**, 739.

Fischer, R., Schillberg, S., Buyel, J.F. and Twyman, R.M. (2013) Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. *Curr Pharm Des* **19**, 5471-5477.

Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R.M. and Drossard, J. (2012) GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv* **30**, 434-439.

Floss, D.M., Falkenburg, D. and Conrad, U. (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* **16**, 315-332.

Geda, D., Valdés, R., Escobar, A., Ares, D.M., Torres, E., Blanco, R., Ferro, W., Dorta, D., González, M., Alemán, M.R., Padilla, S., Gómez, L., del Castillo, N., Mendoza, O., Urquiza, D., Soria, Y., Brito, J., Leyva, A., Borroto, C. and Gavilondo, J.V. (2007) Detection of Rubisco and mycotoxins as potential contaminants of a plantibody against the hepatitis B surface antigen purified from tobacco. *Biologicals* **35**, 309-315.

Gelvin, S.B. (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-Jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol R* **67**, 16-+.

Gelvin, S.B. (2003) Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends Biotechnol* **21**, 95-98.

Gilroy, E.M., Hein, I., van der Hoorn, R., Boevink, P.C., Venter, E., McLellan, H., Kaffarnik, F., Hrubikova, K., Shaw, J., Holeva, M., Lopez, E.C., Borrás-Hidalgo, O., Pritchard, L., Loake, G.J., Lacomme, C. and Birch, P.R. (2007) Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant J* **52**, 1-13.

Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2005) High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J* **3**, 613-620.

Girard, C., Rivard, D., Kiggundu, A., Kunert, K., Gleddie, S.C., Cloutier, C. and Michaud, D. (2007) A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*. *New Phytol* **173**, 841-851.

Giri, A.P., Wunsche, H., Mitra, S., Zavala, J.A., Muck, A., Svatos, A. and Baldwin, I.T. (2006) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. *Plant Physiol* **142**, 1621-1641.

- Gomez, S., Ferrieri, R.A., Schueller, M. and Orians, C.M. (2010) Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. *New Phytol* **188**, 835-844.
- Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R. and Faye, L. (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* **23**, 559-565.
- Gomord, V. and Faye, L. (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 171-181.
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D. and Faye, L. (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J* **8**, 564-587.
- Gomord, V., Sourrouille, C., Fitchette, A.C., Bardor, M., Pagny, S., Lerouge, P. and Faye, L. (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J* **2**, 83-100.
- Goncalves, A.M., Pedro, A.Q., Maia, C., Sousa, F., Queiroz, J.A. and Passarinha, L.A. (2013) *Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *J Microbiol Biotechnol* **23**, 587-601.
- Gooderham, K. (1984) Transfer techniques in protein blotting. *Methods Mol Biol* **1**, 165-178.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A. (2008) *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1015-1026.
- Goossens, A., Van Montagu, M. and Angenon, G. (1999) Co-introduction of an antisense gene for an endogenous seed storage protein can increase expression of a transgene in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Febs Letters* **456**, 160-164.
- Goulet, C., Benchabane, M., Anguenot, R., Brunelle, F., Khalf, M. and Michaud, D. (2010) A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol J* **8**, 142-154.
- Goulet, C., Goulet, C., Goulet, M.C. and Michaud, D. (2010) 2-DE proteome maps for the leaf apoplast of *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics* **10**, 2536-2544.

Goulet, C., Khalf, M., Sainsbury, F., D'Aoust, M.A. and Michaud, D. (2012) A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnol J* **10**, 83-94.

Goulet, M.C., Dallaire, C., Vaillancourt, L.P., Khalf, M., Badri, A.M., Preradov, A., Duceppe, M.O., Goulet, C., Cloutier, C. and Michaud, D. (2008) Tailoring the specificity of a plant cystatin toward herbivorous insect digestive cysteine proteases by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant Physiol* **146**, 1010-1019.

Guevara, M.G., Almeida, C., Mendieta, J.R., Faro, C.J., Verissimo, P., Pires, E.V. and Daleo, G.R. (2005) Molecular cloning of a potato leaf cDNA encoding an aspartic protease (StAsp) and its expression after *P. infestans* infection. *Plant Physiol Biochem* **43**, 882-889.

Hassan, S., van Dolleweerd, C.J., Ioakeimidis, F., Keshavarz-Moore, E. and Ma, J.K. (2008) Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* **6**, 733-748.

Hehle, V.K., Paul, M.J., Drake, P.M., Ma, J.K. and van Dolleweerd, C.J. (2011) Antibody degradation in tobacco plants: a predominantly apoplastic process. *BMC Biotechnol* **11**, 128.

Heil, M. and Bostock, R.M. (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot* **89**, 503-512.

Hermesmeier, D., Schittko, U. and Baldwin, I.T. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol* **125**, 683-700.

Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of Antibodies in Transgenic Plants. *Nature* **342**, 76-78.

Horger, A.C. and van der Hoorn, R.A. (2013) The structural basis of specific protease-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 842-850.

Howing, T., Huesmann, C., Hoefle, C., Nagel, M.K., Isono, E., Huckelhoven, R. and Gietl, C. (2014) Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense. *Front Plant Sci* **5**, 58.

Huang, T.K., Plesha, M.A., Falk, B.W., Dandekar, A.M. and McDonald, K.A. (2009) Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Bioeng* **102**, 508-520.

Huang, Z., Chen, Q., Hjelm, B., Arntzen, C. and Mason, H. (2009) A DNA Replicon System for Rapid High-Level Production of Virus-Like Particles in Plants. *Biotechnol Bioeng* **103**, 706-714.

Ikonomou, L., Schneider, Y.J. and Agathos, S.N. (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 1-20.

Imai, K., Suzuki, Y., Mae, T. and Makino, A. (2008) Changes in the synthesis of rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx. *Ann Bot* **101**, 135-144.

Jamal, A., Ko, K., Kim, H.S., Choo, Y.K. and Joung, H. (2009) Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming. *Biotechnol Adv* **27**, 914-923.

Jiang, X., Oohira, K., Iwasaki, Y., Nakano, H., Ichihara, S. and Yamane, T. (2002) Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system of Escherichia coli. *J Biosci Bioeng* **93**, 151-156.

Jing, H.C., Hille, J. and Dijkwel, P.P. (2003) Ageing in Plants: Conserved Strategies and Novel Pathways. *Plant Biology* **5**, 455-464.

Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B. and Menassa, R. (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in Nicotiana benthamiana. *Plant Physiol* **152**, 622-633.

Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J.S., Choi, Y.D. and Cheong, J.J. (2007) Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Rep* **26**, 1053-1063.

Jung, S.K., Lindenmuth, B.E., McDonald, K.A., Hwang, H., Bui, M.Q., Falk, B.W., Uratsu, S.L., Phu, M.L. and Dandekar, A.M. (2014) Agrobacterium tumefaciens mediated transient expression of plant cell wall-degrading enzymes in detached sunflower leaves. *Biotechnol Prog* **30**, 905-915.

Karg, S.R. and Kallio, P.T. (2009) The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnol Adv* **27**, 879-894.

- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S. and van der Hooft, R.A. (2010) An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol* **154**, 1794-1804.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E. and Aebersold, R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392.
- Khalf, M., Goulet, C., Vorster, J., Brunelle, F., Anguenot, R., Fliss, I. and Michaud, D. (2010) Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. *Plant Biotechnol J* **8**, 155-169.
- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R. and Vezina, L.P. (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* **64**, 135-143.
- Kiggundu, A., Goulet, M.C., Goulet, C., Dubuc, J.F., Rivard, D., Benchabane, M., Pepin, G., van der Vyver, C., Kunert, K. and Michaud, D. (2006) Modulating the proteinase inhibitory profile of a plant cystatin by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant J* **48**, 403-413.
- Kim, Y.M., Lee, J.Y., Lee, T., Lee, Y.H., Kim, S.H., Kang, S.H., Yoon, U.H., Ha, S.H. and Lim, S.H. (2012) The suppression of the glutelin storage protein gene in transgenic rice seeds results in a higher yield of recombinant protein. *Plant Biotechnol Rep* **6**, 347-353.
- Kirk, D.D. and Webb, S.R. (2005) The next 15 years: taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol Cell Biol* **83**, 248-256.
- Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Yakoby, N., Garvey, A. and Raskin, I. (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiol* **141**, 1185-1193.
- Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E. and Dorokhov, Y.L. (2010) Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev Vaccines* **9**, 859-876.
- Kuroda, M., Kimizu, M. and Mikami, C. (2010) A simple set of plasmids for the production of transgenic plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 2348-2351.
- Lacroix, B., Li, J.X., Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006) Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can J Physiol Pharm* **84**, 333-345.

- Lawrence, S.D., Novak, N.G., Ju, C.J. and Cooke, J.E. (2008) Potato, *Solanum tuberosum*, defense against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say): microarray gene expression profiling of potato by Colorado potato beetle regurgitant treatment of wounded leaves. *J Chem Ecol* **34**, 1013-1025.
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X. and Chen, Q. (2013) Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J Vis Exp*.
- Lienard, D., Sourrouille, C., Gomord, V. and Faye, L. (2007) Pharming and transgenic plants. *Biotechnol Annu Rev* **13**, 115-147.
- Lienard, D., Tran Dinh, O., van Oort, E., Van Overtvelt, L., Bonneau, C., Wambre, E., Bardor, M., Cosette, P., Didier-Laurent, A., de Borne, F.D., Delon, R., van Ree, R., Moingeon, P., Faye, L. and Gomord, V. (2007) Suspension-cultured BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens. *Plant Biotechnol J* **5**, 93-108.
- Lim, P.O., Kim, H.J. and Nam, H.G. (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 115-136.
- Lin, J.-F. and Wu, S.-H. (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **39**, 612-628.
- Lindbo, J.A. (2007) TRBO: A high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-Based overexpression vector. *Plant Physiol* **145**, 1232-1240.
- Liu, J., Wu, Y.H., Yan, J.J., Liu, Y.D. and Shen, F.F. (2008) Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *J Plant Biol* **51**, 11-19.
- Lombardi, R., Villani, M.E., Di Carli, M., Brunetti, P., Benvenuto, E. and Donini, M. (2010) Optimisation of the purification process of a tumour-targeting antibody produced in *N. benthamiana* using vacuum-agroinfiltration. *Transgenic Res* **19**, 1083-1097.
- Ma, J.K., Barros, E., Bock, R., Christou, P., Dale, P.J., Dix, P.J., Fischer, R., Irwin, J., Mahoney, R., Pezzotti, M., Schillberg, S., Sparrow, P., Stoger, E. and Twyman, R.M. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep* **6**, 593-599.
- Ma, J.K., Drake, P.M. and Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* **4**, 794-805.

- Ma, J.K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**, 716-719.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249-270.
- Mahajan, N.S., Mishra, M., Tamhane, V.A., Gupta, V.S. and Giri, A.P. (2014) Stress inducible proteomic changes in *Capsicum annuum* leaves. *Plant Physiol Biochem* **74**, 212-217.
- Makhzoum, A., Benyammi, R., Moustafa, K. and Tremouillaux-Guiller, J. (2014) Recent advances on host plants and expression cassettes' structure and function in plant molecular pharming. *BioDrugs* **28**, 145-159.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1984) Relation between Nitrogen and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in Rice Leaves from Emergence through Senescence. *Plant Cell Physiol* **25**, 429-437.
- Mamedov, T., Ghosh, A., Jones, R.M., Mett, V., Farrance, C.E., Musiyuchuk, K., Horsey, A. and Yusibov, V. (2012) Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnol J* **10**, 773-782.
- Mandal, M.K., Fischer, R., Schillberg, S. and Schiermeyer, A. (2014) Inhibition of protease activity by antisense RNA improves recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) suspension cells. *Biotechnol J* **9**, 1065-1073.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnol* **23**, 718-723.
- Matoba, N., Kajiura, H., Cherni, I., Doran, J.D., Bomsel, M., Fujiyama, K. and Mor, T.S. (2009) Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR. *Plant Biotechnol J* **7**, 129-145.
- Maxmen, A. (2012) Drug-making plant blooms. *Nature* **485**, 160.
- Menkhaus, T.J., Bai, Y., Zhang, C., Nikolov, Z.L. and Glatz, C.E. (2004) Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnol Prog* **20**, 1001-1014.



- Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Pezzotti, M. and Avesani, L. (2014) Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *Biomed Res Int* **2014**, 136419.
- Michaud, D. (2011) In consideration of GMOs: a virtual special issue of the Plant Biotechnology Journal. *Plant Biotechnol J* **9**, 933-935.
- Michaud, D., Cantin, L. and Vrain, T.C. (1995) Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. *Arch Biochem Biophys* **322**, 469-474.
- Mitra, S. and Baldwin, I.T. (2008) Independently silencing two photosynthetic proteins in *Nicotiana attenuata* has different effects on herbivore resistance. *Plant Physiol* **148**, 1128-1138.
- Moura, D.S. and Ryan, C.A. (2001) Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **126**, 289-298.
- Munger, A., Coenen, K., Cantin, L., Goulet, C., Vaillancourt, L.P., Goulet, M.C., Tweddell, R., Sainsbury, F. and Michaud, D. (2012) Beneficial 'unintended effects' of a cereal cystatin in transgenic lines of potato, *Solanum tuberosum*. *BMC Plant Biol* **12**, 198.
- Muntz, K. (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J Exp Bot* **58**, 2391-2407.
- Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E. and Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646-4658.
- Nierner, M., Mehofer, U., Torres Acosta, J.A., Verdianz, M., Henkel, T., Loos, A., Strasser, R., Maresch, D., Rademacher, T., Steinkellner, H. and Mach, L. (2014) The human anti-HIV antibodies 2F5, 2G12, and PG9 differ in their susceptibility to proteolytic degradation: down-regulation of endogenous serine and cysteine proteinase activities could improve antibody production in plant-based expression platforms. *Biotechnol J* **9**, 493-500.
- Noir, S., Bomer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T.L., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K. and Devoto, A. (2013) Jasmonate Controls Leaf Growth by Repressing Cell Proliferation and the Onset of Endoreduplication while Maintaining a Potential Stand-By Mode. *Plant Physiol* **161**, 1930-1951.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. and Reddy, S.V. (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* **29**, 210-222.

Okada, K., Abe, H. and Arimura, G.-I. (2015) Jasmonates Induce Both Defense Responses and Communication in Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol* **56**, 16-27..

Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Staehelin, L.A., Amasino, R.M. and Guiamet, J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J* **41**, 831-844.

Outchkourov, N.S., Rogelj, B., Strukelj, B. and Jongsma, M.A. (2003) Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol* **133**, 379-390.

Pacurar, D.I., Thordal-Christensen, H., Pacurar, M.L., Pamfil, D., Botez, C. and Bellini, C. (2011) *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol Mol Plant P* **76**, 76-81.

Paul, M. and Ma, J.K. (2011) Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol Appl Biochem* **58**, 58-67.

Paul, M., van Dolleweerd, C., Drake, P.M., Reljic, R., Thangaraj, H., Barbi, T., Stylianou, E., Pepponi, I., Both, L., Hehle, V., Madeira, L., Inchakalody, V., Ho, S., Guerra, T. and Ma, J.K. (2011) Molecular Pharming: future targets and aspirations. *Hum Vaccin* **7**, 375-382.

Pauwels, L., Inze, D. and Goossens, A. (2009) Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci* **14**, 87-91.

Peckham, G.D., Bugos, R.C. and Su, W.W. (2006) Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures. *Protein Expr Purif* **49**, 183-189.

Penney, C.A., Thomas, D.R., Deen, S.S. and Walmsley, A.M. (2011) Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals. *Plant Cell Rep* **30**, 789-798.

Pillay, P., Kibido, T., du Plessis, M., van der Vyver, C., Beyene, G., Vorster, B.J., Kunert, K.J. and Schluter, U. (2012) Use of transgenic oryzacystatin-I-expressing plants enhances recombinant protein production. *Appl Biochem Biotechnol* **168**, 1608-1620.

Pillay, P., Schluter, U., van Wyk, S., Kunert, K.J. and Vorster, B.J. (2014) Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells. *Bioengineered* **5**, 15-20.

- Pinkhasov, J., Alvarez, M.L., Rigano, M.M., Piensook, K., Larios, D., Pabst, M., Grass, J., Mukherjee, P., Gendler, S.J., Walmsley, A.M. and Mason, H.S. (2011) Recombinant plant-expressed tumour-associated MUC1 peptide is immunogenic and capable of breaking tolerance in MUC1.Tg mice. *Plant Biotechnol J* **9**, 991-1001.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. and Mattanovich, D. (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol* **31**, 245-259.
- Potenza, C., Aleman, L. and Sengupta-Gopalan, C. (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev-Pl* **40**, 1-22.
- Ramirez, V., Lopez, A., Mauch-Mani, B., Gil, M.J. and Vera, P. (2013) An extracellular subtilase switch for immune priming in Arabidopsis. *PLoS Pathog* **9**, e1003445.
- Richter, K. and Gescher, J. (2012) The molecular toolbox for chromosomal heterologous multiprotein expression in Escherichia coli. *Biochem Soc Trans* **40**, 1222-1226.
- Rivard, D., Anguenot, R., Brunelle, F., Le, V.Q., Vezina, L.P., Trepanier, S. and Michaud, D. (2006) An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants. *Plant Biotechnol J* **4**, 359-368.
- Rivard, D., Cloutier, C. and Michaud, D. (2004) Colorado potato beetles show differential digestive compensatory responses to host plants expressing distinct sets of defense proteins. *Arch Insect Biochem Physiol* **55**, 114-123.
- Rivard, D., Girard, C., Anguenot, R., Vezina, L.P., Trepanier, S. and Michaud, D. (2007) MsCYS1, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. *Plant Physiol Bioch* **45**, 508-514.
- Robert, S., Khalf, M., Goulet, M.C., D'Aoust, M.A., Sainsbury, F. and Michaud, D. (2013) Protection of Recombinant Mammalian Antibodies from Development-Dependent Proteolysis in Leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Plos One* **8**, e70203.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J.D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 317-343.
- Ross, K.C. and Zhang, C. (2010) Separation of recombinant  $\beta$ -glucuronidase from transgenic tobacco by aqueous two-phase extraction. *Biocheml Eng Jl* **49**, 343-350.

Rozkov, A. and Enfors, S.O. (2004) Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**, 163-195.

Rubin, H. (1992) The biology and biochemistry of antichymotrypsin and its potential role as a therapeutic agent. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**, 497-502.

Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 112-121.

Rybicki, E.P. (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J* **8**, 620-637.

Rybicki, E.R. (2009) Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov Today* **14**, 16-24.

Sabalza, M., Christou, P. and Capell, T. (2014) Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnol Lett* **36**, 2367-2379.

Sabalza, M., Christou, P. and Capell, T. (2014) Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnol Lett* **36**, 2367-2379.

Sack, M., Hofbauer, A., Fischer, R. and Stoger, E. (2015) The increasing value of plant-made proteins. *Curr Opin Biotechnol* **32C**, 163-170.

Sainsbury, F., Benchabane, M., Goulet, M.C. and Michaud, D. (2012) Multimodal protein constructs for herbivore insect control. *Toxins (Basel)* **4**, 455-475.

Sainsbury, F., Lavoie, P.O., D'Aoust, M.A., Vezina, L.P. and Lomonosoff, G.P. (2008) Expression of multiple proteins using full-length and deleted versions of cowpea mosaic virus RNA-2. *Plant Biotechnol J* **6**, 82-92.

Sainsbury, F. and Lomonosoff, G.P. (2008) Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiol* **148**, 1212-1218.

Sainsbury, F. and Lomonosoff, G.P. (2014) Transient expressions of synthetic biology in plants. *Curr Opin Plant Biol* **19C**, 1-7.

Sainsbury, F., Rheume, A.J., Goulet, M.C., Vorster, J. and Michaud, D. (2012) Discrimination of differentially inhibited cysteine proteases by activity-based profiling using cystatin variants with tailored specificities. *J Proteome Res* **11**, 5983-5993.

Sainsbury, F., Saxena, P., Aljabali, A.A., Saunders, K., Evans, D.J. and Lomonossoff, G.P. (2014) Genetic engineering and characterization of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles. *Methods Mol Biol* **1108**, 139-153.

Sainsbury, F., Thuenemann, E.C. and Lomonossoff, G.P. (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* **7**, 682-693.

Sainsbury, F., Varennes-Jutras, P., Goulet, M.C., D'Aoust, M.A. and Michaud, D. (2013) Tomato cystatin SlCYS8 as a stabilizing fusion partner for human serpin expression in plants. *Plant Biotechnol J*.

Saravanan, R.S. and Rose, J.K. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522-2532.

Saunders, K., Sainsbury, F. and Lomonossoff, G.P. (2009) Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology* **393**, 329-337.

Schaller, A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183-197.

Schiermeyer, A., Schinkel, H., Apel, S., Fischer, R. and Schillberg, S. (2005) Production of *Desmodus rotundas* salivary plasminogen activator alpha 1 (DSPA alpha 1) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnol Bioeng* **89**, 848-858.

Schillberg, S., Twyman, R.M. and Fischer, R. (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants--technology assessment. *Vaccine* **23**, 1764-1769.

Schmidt, M.A. and Herman, E.M. (2008) Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation. *Plant Biotechnol J* **6**, 832-842.

Shang, J., Xi, D.H., Xu, F., Wang, S.D., Cao, S., Xu, M.Y., Zhao, P.P., Wang, J.H., Jia, S.D., Zhang, Z.W., Yuan, S. and Lin, H.H. (2011) A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* **233**, 299-308.

Sharp, J.M. and Doran, P.M. (2001) Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol Bioeng* **73**, 338-346.

Sharp, J.M. and Doran, P.M. (2001) Factors affecting antibody accumulation and stability in plant cell and organ cultures. *Abstr Pap Am Chem S* **221**, U110-U110.

Sharp, J.M. and Doran, P.M. (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Progr* **17**, 979-992.

Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A. and Kuchuk, N.V. (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnol Bioeng* **96**, 608-614.

Shigemitsu, T., Ozaki, S., Saito, Y., Kuroda, M., Morita, S., Satoh, S. and Masumura, T. (2012) Production of human growth hormone in transgenic rice seeds: co-introduction of RNA interference cassette for suppressing the gene expression of endogenous storage proteins. *Plant Cell Rep* **31**, 539-549.

Shorrosh, B.S. and Dixon, R.A. (1991) Molecular cloning of a putative plant endomembrane protein resembling vertebrate protein disulfide-isomerase and a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10941-10945.

Smith, B.J. (1984) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol* **1**, 41-55.

Smith, J.L., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2009) Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag Sci* **65**, 497-503.

Spitsin, S., Andrianov, V., Pogrebnyak, N., Smirnov, Y., Borisjuk, N., Portocarrero, C., Veguilla, V., Koprowski, H. and Golovkin, M. (2009) Immunological assessment of plant-derived avian flu H5/HA1 variants. *Vaccine* **27**, 1289-1292.

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. and Pieterse, C.M. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.

Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L.A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55-62.

Stanton, M.A., Ullmann-Zeunert, L., Wielsch, N., Bartram, S., Svatos, A., Baldwin, I.T. and Groten, K. (2013) Silencing ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression does not disrupt nitrogen allocation to defense after simulated herbivory in *Nicotiana attenuata*. *Plant Signal Behav* **8**, e27570.

Stevens, L.H., Stoopen, G.M., Elbers, I.J.W., Molthoff, J.W., Bakker, H.A.C., Lommen, A., Bosch, D. and Jordi, W. (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **124**, 173-182.

Stoger, E., Fischer, R., Moloney, M. and Ma, J.K. (2014) Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 743-768.

Stoger, E., Ma, J.K., Fischer, R. and Christou, P. (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 167-173.

Streatfield, S.J. (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* **5**, 2-15.

Streatfield, S.J., Lane, J.R., Brooks, C.A., Barker, D.K., Poage, M.L., Mayor, J.M., Lamphear, B.J., Drees, C.F., Jilka, J.M., Hood, E.E. and Howard, J.A. (2003) Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* **21**, 812-815.

Thaler, J.S., Fidantsef, A.L. and Bostock, R.M. (2002) Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: Effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *J Chem Ecol* **28**, 1131-1159.

Tiwari, S., Verma, P.C., Singh, P.K. and Tuli, R. (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv* **27**, 449-467.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.

Tremblay, R., Diao, H., Hüner, N., Jevnikar, A.M. and Ma, S. (2011) The development of a high-yield recombinant protein bioreactor through RNAi induced knockdown of ATP/ADP transporter in *Solanum tuberosum*. *J Biotechnol* **156**, 59-66.

Twyman, R.M., Schillberg, S. and Fischer, R. (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs* **10**, 185-218.

Ullmann-Zeunert, L., Stanton, M.A., Wielsch, N., Bartram, S., Hummert, C., Svatos, A., Baldwin, I.T. and Groten, K. (2013) Quantification of growth-defense trade-offs in a common currency: nitrogen required for phenolamide biosynthesis is not derived from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase turnover. *Plant J* **75**, 417-429.

van der Hoorn, R.A.L. (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 191-223.

Van der Vyver, C., Schneidereit, J., Driscoll, S., Turner, J., Kunert, K. and Foyer, C.H. (2003) Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnol J* **1**, 101-112.

Veena, Jiang, H., Doerge, R.W. and Gelvin, S.B. (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J* **35**, 219-236.

Vezina, 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 Biotechnol J* **7**, 442-455.

Vierstra, R.D. (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* **32**, 275-302.

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. *Plant J* **33**, 949-956.

Watson, J.M., Fusaro, A.F., Wang, M. and Waterhouse, P.M. (2005) RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett* **579**, 5982-5987.

Wei, Z., Hu, W., Lin, Q., Cheng, X., Tong, M., Zhu, L., Chen, R. and He, G. (2009) Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*): a proteomic approach. *Proteomics* **9**, 2798-2808.

Werner, S., Marillonnet, S., Hause, G., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2006) Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17678-17683.

Wilken, L.R. and Nikolov, Z.L. (2012) Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol Adv* **30**, 419-433.

Woodard, S.L., Wilken, L.R., Barros, G.O., White, S.G. and Nikolov, Z.L. (2009) Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic *Lemna* for purification process development. *Biotechnol Bioeng* **104**, 562-571.



Wroblewski, T., Tomczak, A. and Michelmore, R. (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* **3**, 259-273.

Wydro, M., Kozubek, E. and Lehmann, P. (2006) Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol* **53**, 289-298.

Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A. and Lamb, C. (2004) An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *EMBO J* **23**, 980-988.

Xu, J., Dolan, M.C., Medrano, G., Cramer, C.L. and Weathers, P.J. (2012) Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv* **30**, 1171-1184.

Yang, J., Barr, L.A., Fahnestock, S.R. and Liu, Z.B. (2005) High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* **14**, 313-324.

Yuan, Z.C., Edlind, M.P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L.M., Wise, A.A., Ronzone, E., Binns, A.N., Kerr, K. and Nester, E.W. (2007) The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11790-11795.

Zhang, C., Lillie, R., Cotter, J. and Vaughan, D. (2005) Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. *J Chromatogr A* **1069**, 107-112.

Zhong, Q., Xu, L., Zhang, C. and Glatz, C.E. (2007) Purification of recombinant aprotinin from transgenic corn germ fraction using ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 607-613.

Zubo, Y.O., Yamburenko, M.V., Kusnetsov, V.V. and Borner, T. (2011) Methyl jasmonate, gibberellic acid, and auxin affect transcription and transcript accumulation of chloroplast genes in barley. *J Plant Physiol* **168**, 1335-1344.



## **Annexe**

### **Companion protease inhibitors for the *in situ* protection of recombinant proteins in plants**

**Robert S, Jutras PV, Khalf M, D'Aoust M-A, Goulet M-C, Sainsbury F, Michaud D**

#### **Chapitre de livre<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Chapitre de livre à paraître sous peu dans l'ouvrage *Recombinant Proteins from Plants : Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, vol. 1385, MacDonald J, Kolotilin I, Menassa R (Eds). Springer, New York, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3289-4\_8.



# Companion protease inhibitors for the *in situ* protection of recombinant proteins in plants

Stéphanie Robert,<sup>1</sup> Philippe V. Jutras,<sup>1</sup> Moustafa Khalf,<sup>1</sup> Marc-André D'Aoust,<sup>2</sup> Marie-Claire Goulet,<sup>1</sup> Frank Sainsbury<sup>1,3</sup> and Dominique Michaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche et d'innovation sur les végétaux, Université Laval, Québec, Canada

<sup>2</sup> Medicago inc., Québec, Canada

<sup>3</sup> Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, St Lucia, Australia

Corresponding author: Dominique Michaud <dominique.michaud@fsaa.ulaval.ca>.

## Summary

We previously described a procedure for the use of plant protease inhibitors as 'companion' accessory proteins to prevent unwanted proteolysis of clinically useful recombinant proteins in leaf crude protein extracts [Benchabane et al. (2009) Meth. Mol. Biol. 483, 265–273]. Here we describe the use of these inhibitors for the protection of recombinant proteins *in planta*, before their extraction from leaf tissues. A procedure is first described involving inhibitors co-expressed along with the protein of interest. An alternative, single transgene scheme is then described involving translational fusions of the recombinant protein and companion inhibitor. These approaches may allow for a significant improvement of protein steady-state levels in leaves, comparable to yield improvements observed with protease-deficient strains of less complex protein expression hosts such as *E. coli* or yeasts.

**Key words:** Clinically useful recombinant proteins, Heterologous protein expression, Recombinant protein degradation, Companion protease inhibitors, Protein stabilization

## 1. Introduction

A key challenge in plant molecular pharming is to ensure the integrity and overall quality of the recombinant protein product (1). Unlike many less complex pharmaceuticals, proteins have a natural tendency toward structural heterogeneity, often resulting in a complex mixture of protein variants differing in their primary or tertiary structures (2). One factor influencing the quality and steady-state levels of several recombinant proteins is their limited stability in heterologous cell environments (3, 4). Proteolytic enzymes are involved in various physiological processes in plants (5, 6), but their abundance in most tissues often represents a burden to the effective production of proteins. Whereas a number of recombinant proteins accumulate to satisfactory levels in plant systems, several others undergo partial or complete hydrolysis affecting product quality and yield (4). Studies have reported, for instance, the detrimental impact of host resident proteases against recombinant proteins travelling the plant cell secretory pathway (3). A well-known case is the proteolytic processing of secreted mammalian antibodies in Golgi vesicles, which results in complex patterns of antibody chain fragments together with the expected full-size antibodies (7, 8). Other examples are the clinically useful trypsin/chymotrypsin inhibitors bovine aprotinin and human  $\alpha_1$ -antichymotrypsin (hACT), which undergo partial trimming at the C and/or N terminal ends when retained in the ER or allowed to migrate downstream toward the apoplast (9, 10).

Different strategies have been proposed to stabilize recombinant proteins in plant systems, such as their targeting to alternative subcellular compartments using appropriate peptide sorting signals (2, 4), the addition of a stabilizing fusion partner to drive their sequestration in protein bodies (11), or the antisense-mediated repression of endogenous protease biosynthesis (12). The co-expression of 'companion' pseudosubstrate inhibitors acting as molecular baits for functionally related populations of endogenous proteases in the host plant has also been described (4, 13), either to protect the expressed proteins *ex planta* upon extraction or secretion (14, 15) or to increase their steady-state levels *in planta* before biomass harvesting (16–19). Some years ago we described a procedure for the use of companion protease inhibitors to prevent recombinant protein degradation in leaf crude protein extracts (20). Here we describe procedures for the use of these inhibitors as stabilizing partners *in planta* before protein recovery, using as a model the widely adopted expression host *Nicotiana benthamiana* (21) transiently co-expressing secreted mammalian proteins and cysteine protease inhibitors of the plant cystatin protein family (22).

## **2. Materials**

### **2.1. Plants**

1. Forty-two-day-old, greenhouse-grown *N. benthamiana* plants are used as an example in this article (see **Note 1**). Sowing and growth parameters for *N. benthamiana* plants used as protein expression platforms are detailed in **refs. 23** and **24**.

### **2.2. Gene constructs and vectors**

1. Vectors for *Agrobacterium*-mediated expression of the protein of interest and companion protease inhibitor, or a fusion of the two, are required. As examples, this chapter describes the human blood-typing IgG antibody C5-1 (25), the antifibrinolytic drug bovine aprotinin (26) and the human serpin hACT (27) as recombinant protein models, expressed alone or along with tomato cystatin SICYS8 (28) as a companion protease inhibitor. All four proteins are expressed fused to a native or heterologous N-terminal signal peptide allowing for cellular secretion (see **Note 2**). Transgene constructs and binary vectors for *in planta* expression are described **refs. 17, 29** and **30**.

### **2.3. Agrobacteria**

1. *Agrobacterium tumefaciens* cells, strain AGL1 (see **Note 3**) harbouring the above identified vectors are used as source bacteria for leaf agroinfiltration (see **Subheadings 3.1.1** and **3.2.2**, below).

2. Bacteria transformed with the pEAQexpress vector engineered to express the viral protein p19 (31) are used in parallel to suppress transgene silencing (32).

3. Bacteria carrying 'empty' (no transgene insert) versions of the same vectors that are used as recipients for the protein-encoding transgenes are infiltrated as blank controls.

### **2.4. Special Laboratory Tools and Materials**

1. Vacuum pump and dessicator for leaf agroinfiltration (see **ref. 24** for a visual illustration).
2. Mini-Beadbeater-24 homogenizer (BioSpec Products, Bartlesville OK, USA).
3. 2-mL screw cap microtubes (Sarstedt, Montréal QC, Canada).
4. Qiagen 3-mm tungsten carbide beads (Qiagen, Mississauga ON, Canada).
5. Bio-Rad Mini-Protean III Electrophoresis Unit™ for protein gel electrophoresis (Bio-Rad, Mississauga ON, Canada).

6. Bio-Rad Minitransfer Unit™ for protein electrotransfer to nitrocellulose sheets (Bio-Rad).
7. Hybond C nitrocellulose sheets (GE Healthcare, Baie d'Urfé QC, Canada).
8. Standard reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting (see **refs. 33** and **34**).
9. Microtek ScanMaker II digitalizer (Microtek Laboratory, Torrance CA, USA).
10. Phoretix 2-D Expression software, v. 2005 for gel image analysis (NonLinear USA, Durham NC, USA).
11. Temperature controlled shaking incubator.
12. Refrigerated centrifuge.
13. Basic spectrophotometer.
14. Plant diurnal growth chamber.
15. Circular hole punch (~1-cm<sup>2</sup>).
16. Aluminum foil.
17. Polyvinyl-pyrrolidone.
18. Bradford protein assay kit (Bio-Rad).

## **2.5. Buffers and Other Solutions**

Buffers and inocula are made up as aqueous solutions. Working buffers and step-by-step protocols for the widely used techniques of SDS-PAGE and immunoblotting are described in **refs. 33** and **34**, respectively. For immunodetection, simple procedures involving alkaline phosphatase- or peroxidase-labeled secondary antibodies and appropriate reagents for protein band detection are usually provided by the suppliers.

1. Bacterium inocula: Glycerol stocks of *Agrobacterium* cells grown in liquid LB medium containing 50 µg/mL kanamycin and 100 µg/mL carbenicillin.
2. Leaf infiltration buffer: 10 mM MES- KOH (2-[*N*-morpholino]ethanesulphonic acid), pH 5.6, containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 µM acetosyringone. Prepare fresh.
3. Leaf extraction buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl and the cCOMPLETE protease inhibitor cocktail (1 tablet per 10 mL of extraction buffer) (Roche, Laval QC, Canada, Product No. 04693116001). Prepare fresh.



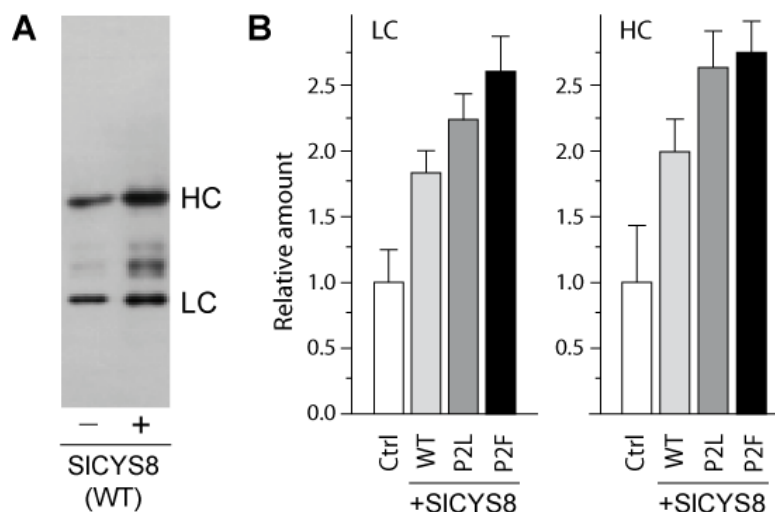
### 3 Methods

#### 3.1. Co-Expressed Companion Inhibitors

A procedure is here described to evaluate the effectiveness of a candidate companion inhibitor in protecting protease-susceptible recombinant proteins transiently expressed in leaves of *N. benthamiana* (see **Note 4**). In brief, the procedure consists of: (i) infiltrating *N. benthamiana* leaves with agrobacterial suspensions harbouring the appropriate transgene-encoding vectors; (ii) recovering leaf proteins after a 6-day incubation phase in growth chamber for heterologous protein expression; and (iii) assessing the impact of companion inhibitor expression on accumulation and integrity of the recombinant protein. Light and heavy chains of the C5-1 antibody expressed alone or in combination with tomato cystatin SICYS8 are taken as an example for demonstration (**Figure 1**).

##### 3.1.1. Bacterial Growth and Leaf Agroinfiltration

1. Grow bacterium inocula to stable phase under agitation at 28°C in LB medium containing 50 µg/mL kanamycin and 100 µg/mL carbenicillin.
2. Centrifuge growth cultures at room temperature for 5 min at 2,000 *g*, and resuspend bacterial pellets in leaf infiltration buffer to an OD<sub>600</sub> of ~0.4.
3. Blend equal volumes of bacterial suspensions harbouring the expression vectors for C5-1, silencing suppressor p19 and companion inhibitor SICYS8, and let stand for 2 h at room temperature before infiltration. A control inoculum is prepared in parallel by mixing bacteria for C5-1 and protein p19 with bacteria carrying the recipient (empty) vector used for SICYS8 construct engineering.



**Figure 1** Transient expression of the human blood-typing IgG antibody C5-1 in leaves of *Nicotiana benthamiana*. The antibody was expressed alone, along with a wild-type (WT) form of tomato cystatin SICYS8, or along with the P2L or P2F variants of SICYS8, which have a stronger affinity for the model plant Cys protease papain (28). **(A)** The C5-1 light (LC) and heavy (HC) chains were immunodetected using appropriate primary and secondary antibodies (see ref. 19), following 12% (w/v) SDS-PAGE in reducing conditions and electrotransfer onto a nitrocellulose membrane. **(B)** The antibody chain signals were quantified by densitometry and compared to signal intensities measured for the antibody chains expressed alone (Ctrl; arbitrary control value of 1.0). Each bar is the mean of three independent (biological replicate) values  $\pm$  SE.

4. Immerse an *N. benthamiana* plant upside down in a vacuum dessicator reservoir filled with appropriate bacterial mixture (see **Note 5**), after covering the plant culture pot with aluminium foil to prevent medium contamination with soil particles. Take care to prevent mechanical damage to leaf tissues.
5. Put the dessicator lid on the reservoir, turn on the vacuum pump, and draw the vacuum until all bubbles are released from the surface of the leaves.
6. Slowly open the dessicator valve to release pressure and allow entrance of agrobacteria into the apoplast interstitial space of the submerged leaves.
7. Remove the plant from the desiccator, return it to an upright position, and repeat **steps 4 to 7** for the other plants to infiltrate.

### 3.1.2. Protein Transient Expression and Recovery

1. Incubate infiltrated plants for six days at 20°C in a growth chamber, under a 16 h:8 h light/dark photoperiod, to allow for cell transfection and transient protein expression (see **Note 6**).
2. Collect three ~1-cm<sup>2</sup> foliar disks on each test plant using a circular hole punch, and put them in a 2-mL microtube containing one tungsten carbide bead for tissue disruption and 10 mg polyvinyl-pyrrolidone to neutralize phenolics. Tissue material must be harvested from leaves of comparable developmental age to avoid confounding effects due to age-dependent transcription and protein turnover rates *in planta* (19). Leaf disks can be quick-frozen in liquid nitrogen and stored for several weeks at –80°C if not used immediately.
3. Add 400 µL of cold leaf extraction buffer to each tube and shake leaf disks for 30 s using a Mini-Beadbeater apparatus.
4. Let mixtures stand on ice for 1 min, and repeat **step 3** once to complete tissue disruption.
5. Centrifuge mixtures at 4°C for 30 min at 20,000 *g* and recover the supernatant for further analysis.
6. Assay total soluble proteins according to Bradford (35), using the Bio-Rad protein assay kit or other standard reagents.
7. Standardize protein content among the extracts by adding leaf extraction buffer.

### 3.1.3. Estimation of Protein Yield Improvement

1. Resolve leaf proteins by SDS-PAGE in reduced conditions using the Bio-Rad Mini-Protean III Electrophoresis Unit™ (see **ref. 33** for a generic procedure). Load 10 µg of leaf protein [in up to 25 µL] in wells of a 1.0-mm thick gel, and perform electrophoretic migration at 150 V until the bromophenol blue tracking dye reaches the bottom of the gel.
2. Transfer resolved proteins onto a nitrocellulose Hybond C membrane using the Bio-Rad Minitransfer Unit™ (see **ref. 34** for a generic procedure).
3. Reveal the light and heavy chains of C5-1 by immunodetection with appropriate antibodies and reagents for color development (19) (**Figure 1A**).

4. Estimate the relative intensity of C5-1 light and heavy chains in test and control extracts by densitometry of the immunoblot signals, using a Microtek ScanMaker II digitalizer and the image analysis software Phoretix 2-D (**Figure 1B**) (see **Note 7**).

### **3.2. Translational Fusion Inhibitors**

A recently described variation of the companion protease inhibitor approach consists of expressing the recombinant inhibitor fused to the protein of interest (29). This approach is well suited in those cases where expression level of the recombinant protein is negatively affected by companion inhibitor co-expression, and/or when structural robustness of the inhibitor confers increased stability to the recombinant protein *in planta*. The general scheme for this approach consists of: (i) designing a stable protein–inhibitor translational fusion; and then (ii) expressing the transgene hybrid sequence and monitoring recombinant protein expression as described above for the co-expressed inhibitor approach (**Subheading 3.1**). Bovine aprotinin and hACT expressed alone, together with tomato cystatin SICYS8, and/or fused to SICYS8 are shown as an example for demonstration purposes (**Figure 2**).

#### **3.2.1. Translational Fusion Design**

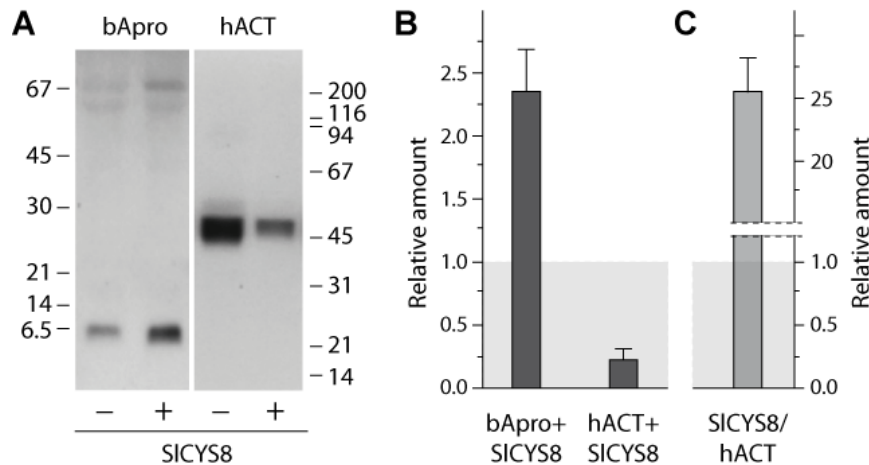
Recombinant fusion proteins are engineered by ligating DNA coding sequences of the proteins, with or without a peptide linker sequence between them to avoid undesired steric interference between the two fusion partners (36). Fusion proteins should be designed based on current knowledge about the structural features of each fusion partner, in such a way as to maximize the distance and/or to minimize interactions between their functionally relevant loops or domains. Peptide linkers that have various structural properties should be assessed empirically for every recombinant protein/companion inhibitor combination, to identify a linker allowing for the translational fusion to remain stable *in planta* (29). **Table 1** lists a number of presumably stable, non-cleavable peptide linkers used to separate fusion protein partners in *N. benthamiana* leaves. **Figure 2** illustrates the differential impact of freely expressed tomato cystatin SICYS8 on steady-state levels of bovine aprotinin and hACT co-expressed in leaves of *N. benthamiana*, and the relevance of using SICYS8 as an N-terminal fusion partner to achieve high-level expression of the human serpin *in planta*.

**Table 1** Examples of non-cleavable peptide linkers used to separate protein partners of translational fusions transiently expressed in leaves of *Nicotiana benthamiana*

Type	Sequence	Refs.
Flexible (Gly-based)	Ser-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) <sub>2</sub> -Gly	29
	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) <sub>3</sub>	37
	(Gly-Gly-Gly-Ser) <sub>3</sub>	38
	Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Asn-Ser	39
	Ser-Gly-Pro-Ser	40
	Gly-Pro-Gly-Pro	40, 41
Rigid	(Glu-Ala-Ala-Ala-Lys) <sub>3</sub>	29, 42

### 3.2.2. Estimation of Protein Yield Improvement

The overall scheme for assessing the potential of a companion inhibitor fusion partner in increasing recombinant protein yield in *N. benthamiana* leaves consists of, as described above for freely co-expressed inhibitors (**Subheading 3.1**): (i) infiltrating *N. benthamiana* leaves with agrobacterial suspensions harbouring the appropriate transgene-encoding vectors; (ii) recovering leaf proteins after a 6-day incubation phase for heterologous expression; and (iii) assessing the impact of companion inhibitor expression on accumulation and integrity of the recombinant protein. Step-by-step procedures detailed in **Subheadings 3.1.1, 3.1.2 and 3.1.3** can be followed as described, except for the use of a single bacterial line harbouring the inhibitor-recombinant protein fusion sequence (**step 4 of Subheading 3.1.1**), and the use of appropriate [e.g. anti-hACT or anti-aprotinin] antibodies for recombinant protein detection (**steps 3 and 4 of Subheading 3.1.3**).



**Figure 2** Transient expression of bovine aprotinin (bApro) and human  $\alpha_1$ -antichymotrypsin (hACT) in *Nicotiana benthamiana* leaves. The proteins were expressed alone, co-expressed with tomato cystatin SICYS8 (bApro+SICYS8, hACT+SICYS8), or fused along with a Gly-rich flexible peptide linker to the C-terminal end of the tomato inhibitor (SICYS8/hACT) (29). **(A)** The two recombinant proteins were immunodetected using appropriate primary and secondary antibodies (29, 30) following 16% (w/v) Tricine-SDS-PAGE (bApro) or 12% (w/v) SDS-PAGE (hACT) in reducing conditions and electrotransfer onto a nitrocellulose membrane. Numbers indicate the mass of commercial protein markers (kDa). **(B)** Relative levels of aprotinin and hACT expressed along with SICYS8 were estimated by densitometric analysis of the immunoblot signals, compared to the proteins expressed alone (Grey area; arbitrary control value of 1.0). **(C)** hACT fused to SICYS8 was quantified by an ELISA procedure, and compared to hACT expressed alone (Grey area; arbitrary value of 1.0) (adapted from ref. 29). Each bar on panels B and C is the mean of three independent (biological replicate) values  $\pm$  SE.

#### 4. Notes

1. *N. benthamiana* is used both as a convenient system for testing the stabilization of poorly stable proteins, and as a widely adopted expression host in plant molecular pharming (21). The companion inhibitor approach works for different plants amenable to agroinfiltration, as observed notably with different cultivars of tobacco, *Nicotiana excelsior* and related species (unpublished data). It also works with stably transformed plants, such as potato and tobacco engineered to express inhibitors active against target proteases of different mechanistic classes (see refs. 16 and 18).
2. Recombinant proteins targeted to the cell secretory pathway are taken here as an example, given the practical relevance of many secreted proteins considered for human disease treatment or diagnostics. The companion inhibitor approach may also be used to stabilize proteins in alternative cell compartments, as illustrated with a cytosol-targeted glutathione reductase in leaves of a rice cystatin-expressing tobacco line (18), a cytosol/nucleus-targeted

form of hACT in leaves of a tomato cathepsin D inhibitor-expressing potato line (16), or an SICYS8–hACT translational fusion in the cytosol of *N. benthamiana* leaf cells (29).

3. Other agrobacterial strains may be used for transient protein expression in *N. benthamiana* leaves, including strains LBA4404, C58C1, EHA105, AGL0 and GV3101.
4. Different inhibitors have been tested to prevent recombinant protein degradation in plant systems, including the Ser-type inhibitors bovine aprotinin and soybean Bowman-Birk inhibitor (14,15), the Kunitz inhibitor of Asp and Ser proteases tomato cathepsin D inhibitor (14,16,17), and Cys-type inhibitors of the plant cystatin family such as rice cystatin I, tomato cystatin SICYS8 and tomato cystatin SICYS9 (17–19). The choice of an effective companion inhibitor remains essentially empirical at this stage, given our still limited knowledge about the specificity of plant proteases and the identity of protease-susceptible sites in most recombinant proteins. Logical schemes are described in refs. 17 and 20 to perform a basic characterization of a host plant's endogenous protease activities, to predict the eventual stability of a recombinant protein in a given plant system, and to identify a potentially effective companion inhibitor for protein protection.
5. A syringe agroinfiltration procedure may also be used to test the companion inhibitors (16,17). Detailed protocols for *N. benthamiana* leaf syringe agroinfiltration are given in refs. 23 and 24.
6. Shorter, e.g. 4- or 5-day incubation periods may be preferable in those cases where very high level expression or toxicity of the recombinant protein induce early necrosis of leaf tissues.
7. A simple, widely applicable quantitative immunodetection approach is suggested here as a first step to quickly generate basic comparative data on yield and integrity of the recombinant protein expressed alone or along with the candidate companion inhibitor. Complementary analytical tools should be used in parallel, such as for instance an ELISA assay for a more reliable quantitation of the protein, or an *in vitro* enzymatic assay to confirm its functional integrity.

## Acknowledgments

Work supported by a Discovery grant from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to DM, and by an NSERC Strategic grant to DM funded in part by Medicago, inc. P. Varennes-Jutras was the recipient of an NSERC/FRQ-NT BPI graduate scholarship supported by Medicago, inc.

## References

1. Sabalza, M., Christou, P., and Capell, T. (2014) Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnol. Lett.* 36, 2367–2379.
2. Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., and Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23, 1770–1778.
3. Doran, P.M. (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol.* 24, 436–432.
4. Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V., and Michaud, D. (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol. J.* 6, 633–648.
5. Schaller, A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183–197.
6. van der Hoorn, R.A. (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 191–223.
7. Gomord, V., Sourrouille, C., Fitchette, A.-C., Bardor, M., Pagny, S., Lerouge, P., and Faye, L. (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol. J.* 2, 83–100.
8. De Muynck, B., Navarre, C., and Boutry, M. (2010) Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol. J.* 8, 529–563.
9. Badri, M.A., Rivard, D., Coenen, K., and Michaud, D. (2009) Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins: the case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* 9, 746–756.
10. Benchabane, M., Saint-Jore-Dupas, C., Bardor, M., Faye, L., Michaud, D., and Gomord, V. (2009) Targeting and post-translational processing of human  $\alpha_1$ -antichymotrypsin in BY-2 tobacco cultured cells. *Plant Biotechnol. J.* 7, 146–160.
11. Conley, A.J., Joensuu, J.J., Richman, A., and Menassa, R. (2011) Protein body-inducing fusions for high-level production of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* 9, 419–433.
12. Mandal, M.K., Fischer, R., Schillberg, S., and Schiermeyer, A. (2014) Inhibition of protease activity by antisense RNA improves recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) suspension cells. *Biotechnol. J.* 9, 1065–1073.



13. Pillay, P., Schlüter, U., van Wyk, S., Kunert, K.J., and Vorster, B.J. (2014) Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells. *Bioengineered* 5, 1–6.
14. Rivard, D., Anguenot, R., Brunelle, F., Le, V.Q., Vézina, L.-P., Trépanier, S., and Michaud, D. (2006) An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 4, 359–368.
15. Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Yakoby, N., Garvey, A., and Raskin, I. (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiol.* 141, 1185–1193.
16. Goulet, C., Benchabane, M., Anguenot, R., Brunelle, F., Khalf, M., and Michaud, D. (2010) A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* 8, 142–154.
17. Goulet, C., Khalf, M., Sainsbury, F., D'Aoust, M.-A., and Michaud, D. (2012) A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnol. J.* 10, 83–94.
18. Pillay, P., Kibido, T., du Plessis, M., van der Vyver, C., Beyene, G., Vorster, B.J., Kunert, K.J., and Schlüter, U. (2012) Use of transgenic oryzacystatin-I-expressing plants enhances recombinant protein production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1608–1620.
19. Robert, S., Khalf, M., Goulet, M.-C., D'Aoust, M.-A., Sainsbury, F., and Michaud, D. (2013) Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 8, e70203.
20. Benchabane, M., Rivard, D., Girard, C., and Michaud, D. (2009) Companion protease inhibitors to protect recombinant proteins in transgenic plant extracts. *Meth. Mol. Biol.* 483, 265–273.
21. Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., and Dent, M. (2013) Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Adv. Tech. Biol. Med.* 1(1): doi:10.4172/atbm.1000103.
22. Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M.-C., and Michaud, D. (2010) Plant cystatins. *Biochimie* 92, 1657–1666.
23. D'Aoust, M.-A., Lavoie, P.-O., Belles-Isles, J., Bechtold, N., Martel, M., and Vézina, L.-P. (2009) Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Meth. Mol. Biol.* 483, 41–49.

24. Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., and Chen, Q. (2013) Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J. Vis. Exp.* 77, e50521.
25. 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 Biotechnol. J.* 7, 442–455.
26. Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro R, and Menegatti, A. (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 4, 231–251.
27. Rubin, H. (1992) The biology and biochemistry of antichymotrypsin and its potential role as a therapeutic agent. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 373, 497–502.
28. Goulet, M.-C., Dallaire, C., Vaillancourt, L.-P., Khalf, M., Badri, M.A., Preradov, A., Duceppe, M.-O., Goulet, C., Cloutier, C., and Michaud, D. (2008) Tailoring the specificity of a plant cystatin toward herbivorous insect digestive cysteine proteases by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant Physiol.* 146, 1010–1019.
29. Sainsbury, F., Varennes-Jutras, P., Goulet, M.-C., D'Aoust, M.-A., and Michaud, D. (2013) Tomato cystatin *S/CYS8* as a stabilizing fusion partner for human serpin expression in plants. *Plant Biotechnol. J.* 11, 1058–1068.
30. Badri, A., Rivard, D., Coenen, K., Vaillancourt, L.-P., Goulet, C., and Michaud, D. (2009) A SELDI-TOF MS procedure for the detection, quantitation and preliminary characterization of low-molecular-weight recombinant proteins expressed in transgenic plants. *Proteomics* 9, 233–241.
31. Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., and Lommonossoff, G.P. (2009) pEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* 7, 682–693.
32. 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. *Plant J.* 33, 949–956.
33. Smith, B.J. (1984) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In J.M. Walker (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. Proteins (pp. 41–55). NJ: Clifton, Humana Press.
34. Gooderham, K. (1984) Transfer techniques in protein blotting. In J.M. Walker (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. Proteins (pp. 165–178). NJ: Clifton, Humana Press.

35. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
36. Sainsbury, F., Benchabane, M., Goulet, M.-C., and Michaud, D. (2012) Multimodal protein constructs for herbivore insect control. *Toxins* 4, 455–475.
37. Choi, J., Diao, H., Feng, Z.-C., Lau, A., Wang, R., Jevnikar, A.M., and Ma, S. (2014) A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. *Plant Biotechnol. J.* 12, 425–435.
38. Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B., and Menassa, R. (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 152, 622–633.
39. Spitsin, S., Andrianov, V., Pogrebnyak, N., Smirnov, Y., Borisjuk, N., Portocarrero, C., Veguilla, V., Koprowski, H., and Golovkin, M. (2009) Immunological assessment of plant-derived avian flu H5/HA1 variants. *Vaccine* 27, 1289–1292.
40. Pinkhasov, J., Alvarez, M.L., Rigano, M.M., Piensook, K., Larios, D., Pabst, M., Grass, J., Mukherjee, P., Gendler, S.J., Walmsley, A.M., and Mason, H.S. (2011) Recombinant plant-expressed tumour-associated MUC1 peptide is immunogenic and capable of breaking tolerance in MUC1.Tg mice. *Plant Biotechnol. J.* 9, 991–1001.
41. Matoba, N., Kajjura, H., Cherni, I., Doran, J.D., Bomsel, M., Fujiyama, K., and Mor, T.S. (2009) Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR. *Plant Biotechnol. J.* 7, 129–145.
42. Werner, S., Marillonnet, S., Hause, G., Klimyuk, V., and Gleba, Y. (2006) Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17678–17683.

© Stéphanie Robert, 2015