

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
NICOLAS DUFOUR

ÉLABORATION D'UN NOUVEAU SYSTÈME DE CRIBLAGE CELLULAIRE
POUR LE GÉNIE GÉNÉTIQUE À PARTIR DU GÉNOME NUCLÉAIRE DE
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

JANVIER 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Il n'y a pas de problèmes, seulement des défis.

Ce sont ceux qui n'abandonnent pas qui réussissent.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice Isabel Desgagné-Penix de m'avoir offert l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche. Son accessibilité et son soutien actif tout au long de mon parcours ont été très appréciés. Mon passage au sein de son laboratoire m'a permis de faire la rencontre de gens inspirants avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Mes deux dernières années d'étude furent pour moi extrêmement agréables et formatrices.

Je tiens à remercier mon codirecteur Hugo Germain de m'avoir si bien transmis ses connaissances et sa passion pour la biologie moléculaire. Son accessibilité et sa qualité d'enseignement sont chez lui des atouts qui ont fortement contribué au succès de ma maîtrise. Un merci spécial pour m'avoir inspiré et supporté dans la réalisation de mon premier marathon. Accomplissement dont je suis très fier.

Merci à ma directrice de baccalauréat Hélène C. Glémet, je lui serai toujours reconnaissant de m'avoir supporté dans mes démarches d'études à l'étranger. Cette expérience m'a permis de vivre des expériences inoubliables et de découvrir la biologie moléculaire, ce qui me motiva à poursuivre mes études dans ce domaine. Je veux aussi la remercier de m'avoir encouragé à réaliser mon stage dans le laboratoire de recherche d'Isabel Desgagné-Penix. Ce stage a été un point tournant dans mon cheminement académique et dans mon choix de carrière.

Je tiens à remercier Andrew Diamond, qui, depuis le début de mon intégration au sein du laboratoire, m'a activement accompagné et formé afin de faire de moi un meilleur chercheur.

Je tiens à remercier ma famille qui, malgré les difficultés et les embûches au cours de mon parcours scolaire, m'a toujours encouragé à persévérer.

RÉSUMÉ

Grâce aux avancées de la biologie synthétique, l'exploitation de microorganismes pour la production de molécules d'intérêt économique est de plus en plus populaire auprès de la communauté scientifique et industrielle. Au cours des dernières années, le potentiel de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* comme plateforme de synthèse de composés d'origine végétale a reçu beaucoup d'attention. L'expression hétérologue à partir du génome nucléaire offre plusieurs avantages par rapport au génome chloroplastique. Entre autres la possibilité pour les protéines recombinantes de subir des modifications post-traductionnelles et d'être envoyées dans différents compartiments cellulaires. Cependant, malgré les récents développements des outils moléculaires pour la manipulation de ce génome, l'obtention de haut niveau d'expression transgénique reste encore un obstacle majeur. De plus, l'insertion aléatoire des transgènes ainsi que la présence de mécanisme de "gene silencing" contribuent à faire varier les niveaux d'expression entre les transformants. De ce fait, de laborieux et coûteux processus de criblage sont nécessaires pour identifier un clone offrant un fort niveau d'expression transgénique. En considérant ces limitations, nous présentons un système de criblage permettant une sélection colorimétrique et semi-quantitative des transformants possédants les meilleurs niveaux d'expression, cela, directement sur le milieu de culture solide. Nous avons combiné les meilleurs outils moléculaires disponibles tels qu'un promoteur fort, une cassette bicistronique, un signal extracellulaire endogénique et d'autres éléments *cis* régulateurs afin de construire une cassette optimisée pour l'expression d'un gène d'intérêt fusionné à un gène rapporteur. Notre vecteur a été spécialement imaginé et conçu pour une future utilisation en ingénierie métabolique. Ce projet offre un nouvel outil qui facilite le génie génétique à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* et qui contribuera à atteindre le plein potentiel de cette microalgue à titre de plateforme de production hétérologue de molécule végétale à haute valeur.

Mots-clés : *Chlamydomonas reinhardtii*, gène rapporteur, expression nucléaire, transgène, génie génétique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Biologie synthétique	1
1.2 Les métabolites spécialisés des plantes	3
1.3 Les microalgues.....	7
1.3.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
1.3.2 Développement biotechnologique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
1.4 Le génome nucléaire.....	12
1.4.1 Les limitations du génome nucléaire	13
1.5 Le but du projet de recherche	14
1.6 Le système de criblage	15
1.6.1 La xylanase comme gène rapporteur	18
1.6.2 Mécanisme biochimique du système de criblage	21
1.7 Outils moléculaires	24
1.8 Choix de la souche uvm4.....	24
1.9 Objectifs et hypothèses du projet de recherche	25
CHAPITRE II	
MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	27
2.1 Tests de faisabilité	27
2.2 Démarche expérimentale	28
2.3 Conception <i>in silico</i> des cassettes d'expression	29
2.3.1 Squelette de base pChlamy_3	29

2.3.2	Promoteur <i>HSP70/RBCS2</i>	31
2.3.3	5'UTR et 3'UTR du gène <i>RBCS2</i>	32
2.3.4	Introns 1, 2 et 3 du gène <i>RBCS2</i>	33
2.3.5	Peptide 2A FMDV	34
2.3.6	Peptide Signal ARS1	36
2.3.7	Xylanease (<i>XYN1</i>).....	37
2.4	Construction du vecteur d'expression pC3_Xyn1	38
2.4.1	Synthèse, amplification et purification des fragments.....	38
2.4.2	Clonage par la méthode de “ <i>Gibson Assembly</i> ”	40
2.5	Amplification et purification du vecteur d'expression pC3_Xyn1.....	40
2.6	Transfection de <i>C. reinhardtii</i> par électroporation	41
2.7	Séquençage par PCR des colonies positives.....	42
2.8	Analyse du niveau d'expression	43
2.9	Western blot (immunobuvardage).....	43
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		45
3.1	Test de faisabilité du système de criblage	45
3.2	Construction du vecteur d'expression pC3_Xyn1	48
3.2.1	Clonage par la méthode de “ <i>Gibson Assembly</i> ”.	49
3.2.2	Amplification du vecteur d'expression pC3_Xyn1	52
3.3	Électroporation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	53
3.4	Séquençage des colonies positives par PCR.....	56
3.5	Analyse du niveau d'expression	57
3.5.1	Extraction d'ARN	57
3.5.2	Amplification par PCR de l'ADNc.....	58
3.6	Analyse protéique	60
3.6.1	Concentration protéique.....	61
3.6.2	Fraction cellulaire	62
3.6.3	Fraction surnageant.....	65

CHAPITRE IV	
DISCUSSION	67
4.1 Test de faisabilité.....	67
4.2 Électroporation	71
4.3 Immunobuvardage.....	74
4.4 Hypothèses.....	75
4.4.1 Changement de cadre de lecture	75
4.4.2 Mauvais fonctionnement du peptide 2A	76
4.4.3 Mauvais repliement de Xyn1	78
4.5 Améliorations	79
4.5.1 Optimisation de la cassette d'expression	79
4.5.2 Optimisation de la démarche expérimentale	80
4.6 Perspectives	81
CHAPITRE VI	
DISCUSSION	83
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Liste des marqueurs de sélection actuellement disponibles pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
1.2	Liste des gènes rapporteurs actuellement disponibles pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
2.1	Liste des éléments génétiques présents dans le vecteur commercial pChlamy_3.....	30
2.2	Liste des peptides signaux endogéniques de <i>C. reinhardtii</i> ayant été exploités (avant 2018) pour la sécrétion de protéines hétérologues à partir du génome nucléaire	37
3.1	Quantification protéique des échantillons de protéines des fractions cellulaires et du surnageant via la méthode de Bradford	62
4.1	Liste des différents paramètres d'électroporation utilisés par plusieurs chercheurs pour la transfection du génome nucléaire de différentes souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	73
A.1	Liste des différentes amorces utilisées lors de ce projet de recherche	85

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma conceptuel de la biologie synthétique	3
1.2a Cycle de vie de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
1.2b Structure anatomique d'une cellule sauvage de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
1.3 Évolution de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> comme organisme modèle en biotechnologie végétale	10
1.4 Principal avantage de l'utilisation du génome nucléaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en biologie synthétique.....	13
1.5 Schématisation de la réaction d'hydrolyse des liaisons β 1,4 du xylane par l'endo- β 1,4-xylanase.....	19
1.6 Schématisation du système de criblage sur gélose RBB-xylane des colonies transformées de <i>C. reinhardtii</i> exprimant davantage notre transgène	21
1.7 Formule chimique du colorant réactif Remazol Brilliant Blue R	22
1.8 Processus chimique de la formation de la liaison covalente entre le colorant réactif Remazol Brilliant Blue R et la molécule de xylane.....	23
2.1 Schéma récapitulatif des différentes étapes expérimentales du présent projet de recherche.....	28
2.2 Schématisation des cassettes d'expression pC3_Xyn1 et pC3_Xyn1_Opt qui ont été conçues par bio-informatique.....	29
2.3 Carte schématique du vecteur commercial pChlamy_3.....	30
2.4 Scématisation du mécanisme de clivage du peptide 2A (<i>Ribosome Skipping</i>) lors de la traduction de notre transgène	36
2.5 Séquence en acide aminés annotée du fragment Xyn1 qui a été synthétisée et puis clonée dans le vecteur commerciale pChlamy_3	39
3.1 Tests de faisabilité du système de criblage sur pétrie RBB-Xylane	47
3.2 Carte annotée du vecteur pChlamy_3_Xyn1 (pC3_Xyn1) (pC3_Xyn1).....	48

3.3	Amplification et linéarisation du vecteur commercial pChlamy_3	49
3.4	Quantification d'ADN et vérification de la pureté des échantillons des fragments pChlamy_3 linéarisé et Xyn1	50
3.5	Vérification du clonage du fragment Xyn1 dans le vecteur pChlamy_3	50
3.6	Alignement de la séquence d'ADN séquencée par Génome Québec avec la séquence <i>in silico</i> de la cassette d'expression pC3_Xyn1	52
3.7	Quantification d'ADN sur gel et vérification de la pureté de l'échantillon finale du vecteur pC3_Xyn1 linéarisé par <i>SspI</i>	53
3.8	Rendement des protocoles d'électroporation #1 et #2 pour la transfection du vecteur pC3_Xyn1 dans le génome nucléaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	55
3.9	Criblage des colonies positives par PCR	56
3.10	Évaluation de la qualité des échantillons d'ARN issus des colonies positives sélectionnées. uvm4 : colonie mère non transformée (Ctr.-)	58
3.11	Amplification par PCR du gène de la phosphoglycerate kinase endogénique au génome nucléaire de <i>C. reinhardtii</i> à partir des échantillons d'ARN et d'ADNc des colonies positives	59
3.12	Amplification du transgène pC3_Xyn1 à partir des échantillons d'ADNc issus des transformants positifs sélectionnés	60
3.13	Schémas illustrant les tailles (kDa) théoriques de XYN1 synthétisée à partir du transgène pC3_Xyn1 en fonction du clivage ou non clivage du peptide 2A lors de la traduction	63
3.14	Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des protéines totales de la fraction cytosolique des transformants positifs sélectionnés	64
3.15	Immunobuvardage de type Western à partir des échantillons de protéines totales solubles cellulaire des transformants positifs	65
3.16	Gel SDS colorée au bleu de Coomassie des protéines totales de la fraction du surnageant des transformants positifs 3, 6 et 24	66
3.17	Immunobuvardage de type western à partir des échantillons de protéines du surnageant des transformants positifs	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

a.a	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfère
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumin
CDS	Coding sequence
FMDV 2A	Foot and mouth disease virus 2A
GOI	Gene of interest
RBB	Remazol Brilliant Blue R
h	Heure
HSE	Heat shock element
HSF1	Heat shock factor 1
MCS	Multiple cloning site
MSP	Métabolite spécialisé des plantes
nt	Nucléotide
ORF	Open reading frame
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction

PolII	Polymerase II
PTM	Post-translational modification
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RPM	Rotation par minute
RT-PCR	reverse transcriptional polymerase chain reaction
SAP11	Synthetic algal promoteur
PS	Signal peptide
TAP	Tris-acetate-phosphate
TBST	Tris-buffered saline tween 20
TC	Time constant
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
WT	Wild type

LISTE DES SYMBOLES

β	Bêta
\downarrow	Clivage
μ	Micro
M	Molaire
mM	Millimolaire
Ω	Ohm
%	Pourcentage
mm	Millimètre
g	Gramme
kDa	Kilodalton
pH	Potentiel hydrogène
L	Litre
U	Unité enzymatique
mU	Milli-unité enzymatique
mL	Millilitre
cell/mL	Cellules par millilitre
V	Volt
F	Farad
°C	Degré Celsius

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Biologie synthétique

Fondamentalement, la biotechnologie a comme mission d'exploiter le vivant à des fins utiles pour l'homme. Depuis des millénaires, les humains de partout dans le monde entretiennent une étroite relation avec la biotechnologie pour plusieurs types d'applications. En réalité, il est sans équivoque que les biotechnologies ont eu un impact majeur dans l'évolution de l'homme moderne et de leurs civilisations. Les grandes découvertes ayant marqué l'histoire des biotechnologies, primitives soient-elles, ont profondément bouleversé les populations humaines et leur mode de vie. Par exemple, la domestication des plantes a permis à nos ancêtres de se sédentariser et de leur assurer une sécurité alimentaire de base. Le développement de l'agriculture a par la suite mené à la domestication d'animaux sauvages ainsi qu'à leur croisement afin d'obtenir des animaux d'élevage mieux adaptés que l'on exploite encore aujourd'hui. La deuxième grande étape notable de la biotechnologie est la découverte des capacités de fermentation des levures et des bactéries pour la production d'une multitude de produits dérivés comme le fromage, le pain, le vinaigre et plusieurs boissons alcoolisées. Ceux-ci sont tous des produits ayant encore aujourd'hui une importance économique majeure. Enfin, la découverte de la génétique représente sans aucun doute l'un des événements les plus marquants concernant notre rapport avec la biotechnologie puisqu'elle nous a permis de redéfinir la manière dont nous pouvons exploiter les organismes vivants.

De 1800 à 1950, le domaine des biotechnologies a été caractérisé par plusieurs découvertes scientifiques fondamentales telles que le concept de l'hérédité par Gregor John Mendel (Mendel 1866), les noyaux dans les cellules par Robert Brown (Brown 1866) ainsi que les nucléines par Friedrich Miescher (1868) (Dahm 2005). À cette époque, ces

découvertes ont été le coup d'envoi qui a permis d'appuyer l'idée que l'ADN serait le matériel de base du transfert de l'information génétique. On peut considérer le début de la biotechnologie moderne lorsque Watson et Crick, en 1953, ont finalement élucidé la structure en double hélice de l'ADN (Watson and Crick 1953). Ce modèle a permis d'expliquer plusieurs mécanismes génétiques tels que la réplication et la transcription. Peu de temps après, en 1961, François Jacob et Jacques Monod ont découvert, pour la première fois, le mécanisme de régulation de l'opéron *Lac* chez la bactérie *Escherichia coli* (Jacob and Monod 1961). Ce nouveau principe par lequel l'expression des gènes serait régulée par d'autres éléments génétiques a fait émerger l'idée de concevoir des nouveaux systèmes artificiels, soit le concept de l'ingénierie génétique. C'est seulement après la découverte des ciseaux à ADN (les enzymes de restriction) en 1970 par le microbiologiste suisse Werner Arber (Arber and Linn 1969) que le premier ADN recombinant a pu être réalisé en 1972 par Paul Berg et son équipe (Jackson, Symons et al. 1972). Le rêve d'exploiter les microorganismes comme usine de production de protéines recombinantes est donc devenu réalité. Au début des années 80, la reconnaissance de l'insuline humaine recombinante par la FDA marque le début d'une nouvelle aire de production à grande échelle de plusieurs composés pharmaceutiques (1982). Depuis ce temps, plusieurs autres protéines recombinantes ont été introduites sur le marché. Seulement de 2009 à 2017, le nombre de protéines pharmaceutiques recombinantes commercialisé est passé de 159 à 239 (Ferrer-Miralles, Domingo-Espín et al. 2009, Usmani, Bedi et al. 2017) représentant un marché global évalué à plus de 347,2 millions d'US \$ en 2016. Suite à l'arrivée de séquenceurs de nouvelle génération et des outils d'analyse bio-informatiques de plus en plus sophistiqués au cours des années 2000, les scientifiques ont pu cumuler plusieurs données génomiques, transcriptomiques, métabolomiques et protéomiques. L'intégration de ces bases de données omiques a ouvert une nouvelle voie appelée la biologie des systèmes. Celle-ci cherche à prédire, à différents niveaux, les interactions ainsi que les réponses cellulaires d'un organisme face à une condition donnée. C'est avec cette vision, davantage holistique que la communauté de chercheurs ont développé des outils moléculaires visant à rationnellement réguler différentes voies métaboliques d'intérêts chez certains microorganismes. Depuis les 10 dernières années, le domaine de la biologie synthétique a connu d'énormes progrès et comprend désormais plusieurs axes de

recherches appliqués dont l'ingénierie métabolique (Cameron, Bashor et al. 2014). Cette jeune discipline tente de rationnellement construire ou améliorer de nouvelles voies métaboliques dans des organismes hétérologues (Figure 1.1). Cette nouvelle approche offre désormais à de nombreux secteurs industriels de produire, non seulement des protéines recombinantes, mais aussi une vaste gamme de biocomposés à haute valeur tels que des pigments, des biopolymères, des précurseurs, des molécules pharmaceutiques, des neutraceutiques et bien plus (Curran and Alper 2012, Abatemarco, Hill et al. 2013). En effet, les métabolites spécialisés des plantes comprennent un vaste potentiel de molécule à haute valeur pour l'homme. C'est pourquoi beaucoup d'efforts sont portés pour tenter d'élucider leurs voies métaboliques afin de les utiliser en biologie synthétique.

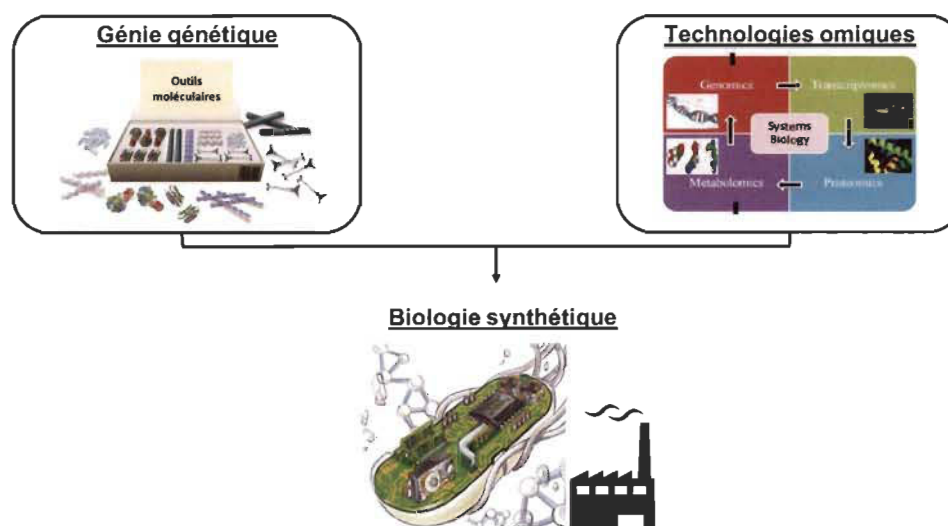


Figure 1.1 Schéma conceptuel de la biologie synthétique. La biologie synthétique combine les technologies omiques avec les principes et les outils moléculaires du génie génétique dans le but de construire, rationnellement, de nouveaux systèmes biologiques d'intérêt commerciale.

1.2 Les métabolites spécialisés des plantes

L'évolution du règne végétal comprend de nombreux exemples démontrant la forte capacité des plantes à s'adapter aux différents milieux présents sur notre Terre. En effet, la sélection naturelle a poussé les végétaux à développer des stratégies de plus en plus complexes afin d'augmenter leur valeur adaptative face à leur environnement. La

production de métabolites spécialisés par plusieurs espèces végétales représente sans doute l'une des stratégies adaptatives la plus importante. Ceux-ci permettent aux plantes d'interagir adéquatement avec leur environnement biotique et abiotique. S'étant adapté à pratiquement tous les types d'écosystèmes, le règne végétal présente une immense diversité de métabolites spécialisés. En fonction de leur structure chimique de base, ceux-ci sont catégorisés en trois principales classes; les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques. Pour la plante elle-même, ces composés peuvent servir à attirer des pollinisateurs ou des disperseurs de graines, à se défendre contre des prédateurs et pathogènes (insectes, herbivores, microbes), à améliorer leur "Fitness lors de stress abiotique et même à communiquer avec les autres plantes environnantes. Certains métabolites spécialisés peuvent être utilisés comme composés allopathiques contre des compétiteurs.

Aujourd'hui, plus de 50 000 métabolites spécialisés des plantes (MSP) ont été identifiés (Wink 2010, Kroymann 2011). En réalité, ce nombre représente qu'une infime proportion de ce qui se trouve dans la nature. Possédant une grande variété d'actions biologiques, ces molécules chimiques végétales sont depuis longtemps exploitées par l'homme à titre de médicament, d'aliment, d'arôme, d'insecticide, de pesticide, etc. (Wurtzel and Kutchan 2016). Bien que ces biomolécules représentent un potentiel économique important pour plusieurs secteurs d'activité, la majeure partie des molécules végétales spécialisées étant commercialisées, sont obtenues par extraction à partir de la plante productrice ou par chimie de synthèse.

La principale limitation associée à l'extraction à partir de la plante est le faible niveau de rendement. De plus, en fonction de chaque espèce, les métabolites spécialisés peuvent être produits en différentes quantités selon les différentes parties de la plante (racine, feuille, tige, graine, etc.), selon les différents stades de croissance (germination, plantule, plante mature, etc.) et finalement selon différentes conditions de stress biotique ou abiotique (Delgoda and Murray 2017). En considérant ces nombreuses variables, il peut devenir difficile d'obtenir en quantité suffisante la molécule d'intérêt. De plus, les étapes de purification subséquentes peuvent parfois être laborieuses et coûteuses.

Finalement, la difficulté ou même l'impossibilité de cultiver à grande échelle certaines espèces de plantes limite encore une fois la gamme de métabolites d'intérêt pouvant être obtenus et donc commercialisés (Liu, Ding et al. 2017). Parallèlement à leur demande croissante, les enjeux liés aux changements climatiques auront un impact majeur au cours des prochaines années sur la sécurité d'approvisionnement de plusieurs MSP.

D'un autre côté, étant donné la grande complexité chimique de plusieurs de ces MSP, leur synthèse chimique peut s'avérer complexe puisqu'elle nécessite des catalyseurs parfois toxiques, des solvants polluants et des intermédiaires coûteux. Dans tous les cas, bien que le règne végétal représente un vaste répertoire de molécules à haute valeur pharmaceutique ou biotechnologique, seulement un très faible pourcentage de ceux-ci sont commercialement disponibles. Face à ces limitations, la production de MSP hétérologue à partir de microorganismes semble représenter une alternative attrayante tant au niveau économique qu'écologique afin d'accroître le potentiel de MSP pouvant être commercialisés. Grâce aux récents progrès qu'a connus la biologie synthétique, la possibilité de reconstruire, étape par étape, une voie de biosynthèse d'un MSP dans un microorganisme hôte est de plus en plus accessible.

Jusqu'à maintenant, la majeure partie des recherches en biologie synthétique ont été axées sur les organismes modèles bien connus tels que la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Du, Shao et al. 2011). En effet, à partir de ces deux microorganismes, plusieurs chercheurs ont démontré de bons résultats pour produire quelques composés végétaux hétérologues tels que des terpénoïdes (Ajikumar, Xiao et al. 2010, Ding, Yan et al. 2014), des alcaloïdes (Hawkins and Smolke 2008, Nakagawa, Minami et al. 2011, Trenchard and Smolke 2015, Diamond and Desgagné-Penix 2016), des polyphénols (Lim, Fowler et al. 2011) et des acides gras végétaux (Zhang, Li et al. 2011). Bien que plusieurs ressources génétiques soient disponibles pour la manipulation d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*, l'utilisation de ces microorganismes pour l'expression de gènes de végétaux présente certains obstacles. Tout d'abord, chez la majorité des eucaryotes, la glycosylation, la phosphorylation ainsi que la formation de ponts disulfure jouent un rôle crucial pour le bon repliement, la stabilité, la solubilité et finalement

l'activité biologique des protéines (Walsh and Jefferis 2006). Les différences de certains de ces mécanismes post-traductionnels (PTM) chez *E. coli* représente l'une des principales limitations pour l'expression de protéines hétérologues actives d'origine végétale (Jenkins 2007). De la même manière, l'absence chez *E. coli* de l'enzyme cytochrome p450 réductase qui est impliquée dans plusieurs voies de biosynthèse de MSP, peut engendrer un frein pour la reconstruction d'une voie métabolique végétale hétérologue (Du, Shao et al. 2011). Concernant la levure *S. cerevisiae*, bien que ce modèle eucaryote soit capable de modification post-traductionnel (PTM), la différence de patron de glycosylation avec celui des cellules végétales peut significativement altérer l'activité de l'enzyme d'intérêt *in vivo* et donc affecter le flux de la voie métabolique insérée (Brooks 2006). De plus, sachant que les différentes étapes enzymatiques d'une voie de MSP surviennent dans différents compartiments cellulaires propres à la cellule végétale, l'absence de plastides chez ces deux organismes modèles peut donc empêcher certaines étapes enzymatiques de se dérouler correctement (Heinig, Gutensohn et al. 2013). Dans le même ordre d'idée, plusieurs MSP sont, lorsqu'ils s'accumulent, toxiques pour la cellule. L'absence de compartiment de stockage telle que la vacuole peut limiter le rendement de production ainsi que la viabilité du système de production hétérologue. Finalement, l'absence de précurseurs ou d'intermédiaire chez l'organisme hôte peut grandement complexifier les étapes de reconstruction d'une voie métabolique hétérologue. Dans cet ordre d'idée, plus on s'adresse aux étapes initiales d'une voie métabolique, plus les chances d'engendrer de la compétition entre différentes voies métaboliques pour un même intermédiaire sont élevées (Xu, Bhan et al. 2013). En considérant ces limitations, il semble évident que l'exploitation d'un organisme modèle végétal phylogénétiquement rapproché des plantes supérieures et pouvant être cultivé à large échelle, permettrait d'accroître la gamme de biomolécules végétales pouvant être produites commercialement. C'est avec cette vision que depuis quelques années, plusieurs chercheurs s'intéressent au potentiel des microalgues comme nouvelle plateforme de production en biologie synthétique (León-Bañares, González-Ballester et al. 2004, Gimpel, Henríquez et al. 2015, Slattery, Diamond et al. 2018).

1.3 Les microalgues

Photosynthétiques, hétérotrophes ou mixotrophes, les microalgues sont des organismes unicellulaires eucaryotes que l'on peut retrouver dans pratiquement tous les types d'écosystèmes, tant en milieu terrestre qu'aquatique. Il est estimé à plus de 70 000, le nombre d'espèces appartenant à ce groupe polyphylétique de 9 embranchements (Norton, Melkonian et al. 1996). De par leur grande diversité, les microalgues produisent plusieurs composés uniques d'intérêt commercial tels que des pigments, des acides gras, des isotopes et plusieurs molécules pharmaceutiques (Spolaore, Joannis-Cassan et al. 2006). Dans ce sens, les microalgues sont depuis longtemps présentes dans plusieurs secteurs industriels tels que l'alimentation, le pharmaceutique, les suppléments alimentaires, l'agriculture, l'aquaculture, les cosmétiques et plusieurs autres (Spolaore, Joannis-Cassan et al. 2006, Mobin and Alam 2017). Récemment, beaucoup d'efforts ont été déployés afin de convertir la biomasse algale en biocarburant (Georgianna and Mayfield 2012). Grâce à leur vitesse de croissance rapide, leur faible coût de production et leur capacité à être cultivées à large échelle, les microalgues ont suscité beaucoup d'intérêt auprès de la communauté scientifique et des industries afin d'être utilisées comme plateforme d'expression hétérologue (Gimpel, Henriquez et al. 2015, O'Neill and Kelly 2016).

Par rapport à *E. coli* et *S. cerevisiae*, l'utilisation des microalgues pour produire des MSP présente plusieurs avantages. Tout d'abord, celles-ci possèdent tous les compartiments cellulaires de base d'une cellule végétale d'une plante supérieure. Ce modèle cellulaire est donc davantage sujet à offrir un environnement physico-chimique optimal pour une protéine hétérologue d'origine végétale. De plus, étant les ancêtres directs des plantes terrestres, les algues vertes (Chlorophyta) présentent plusieurs similitudes au niveau des voies métaboliques spécialisées des plantes (Yoon, Hackett et al. 2004, Chae, Kim et al. 2014). La présence de précurseurs de base pour la synthèse de terpenoïdes et d'isopropanoïdes par exemple, peut contribuer à faciliter la reconstruction d'une voie métabolique spécialisée à partir des microalgues (Liang, Zhu et al. 2018). Jusqu'à présent, la microalgue photosynthétique *Chlamydomonas reinhardtii* est sans

aucun doute l'espèce qui a été le plus intensivement étudiée en laboratoire. *C. reinhardtii* est aujourd'hui considéré comme un organisme modèle en génétique végétale et possède désormais plusieurs outils génétiques permettant de manipuler ses génomes. Pour ces raisons, plusieurs chercheurs s'intéressent activement à cette microalgue afin de l'établir comme organisme hôte en biotechnologie végétale (Scaife, Nguyen et al. 2015).

1.3.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Appartenant à l'embranchement des algues vertes (Chlorophyta), le genre *Chlamydomonas* comprend plus de 459 espèces. *Chlamydomonas reinhardtii* aurait été décrite pour la première fois par Dangeard en 1888. Cependant, la souche initiale (137c) qui a été utilisée à des fins scientifiques a été isolée en 1945 dans un champ de patates au Massachusetts par G-M. Smith. C'est à partir de cette souche que plusieurs autres souches ont ensuite été développées en laboratoire afin d'étudier différents processus biologiques tels que la photosynthèse, la structure de ses flagelles, son cycle cellulaire et plusieurs autres processus biochimiques (Harris 2001). *Chlamydomonas reinhardtii* est une microalgue unicellulaire photosynthétique biflagellée possédant un cycle de reproduction sexuel et asexuel (Figure 1.2). Durant sa forme végétative, les cellules de *C. reinhardtii* existent selon deux "mating type", soient "plus" (*mt+*) ou "moins" (*mt-*) et leur génome est sous forme haploïde. Cette dernière caractéristique représente un avantage pour l'analyse et la modification génétique comparativement à d'autres organismes diploïdes ou polyploïdes comme les plantes. *C. reinhardtii* a aussi la capacité d'assimiler son carbone de manière hétérotrophe via l'acétate présent dans son environnement. La cellule de cette microalgue comporte une paroi cellulaire à 7 couches principalement constituées de glycoprotéine. Généralement de forme circulaire, la taille de cette cellule est d'environ 65 μm^3 , mais peut varier d'un individu à l'autre. Chaque cellule comprend un seul gros chloroplaste contenant un pyrénôïde et un photorécepteur (eyespot), un noyau, des mitochondries, une vacuole, des vésicules cytoplasmiques, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi (Figure 1.3) (Harris, Stern et al. 2009).

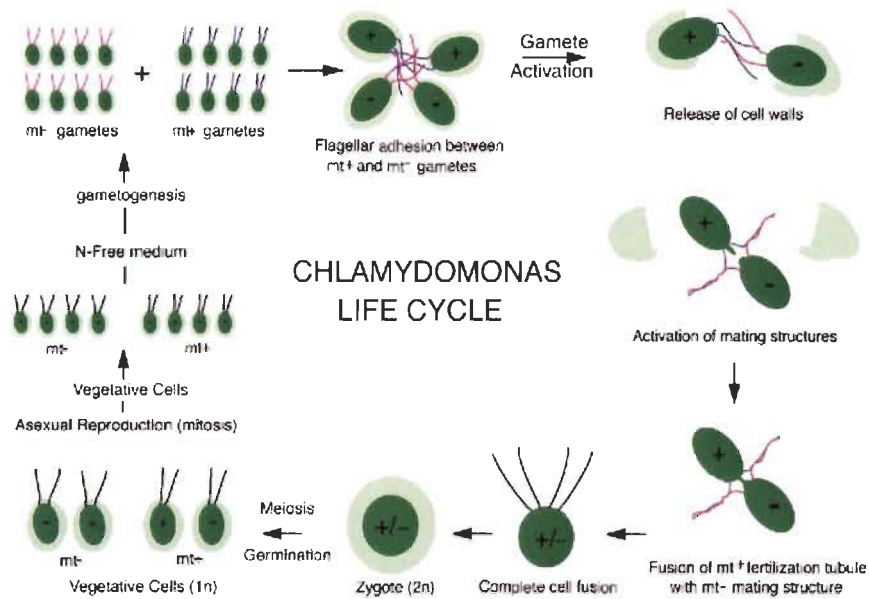


Figure 1.2•• Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*. Adopté de Harris, Stern et al. (2009).

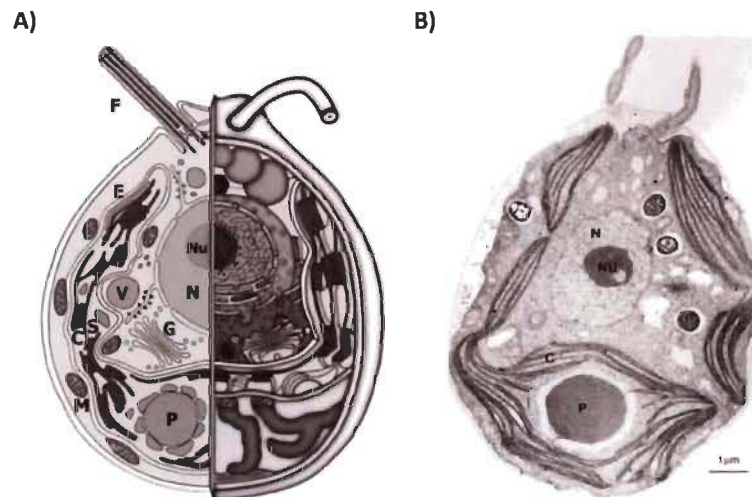


Figure 1.2•• Structure anatomique d'une cellule sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*.

A) Schéma et B) photo par microscope illustrant l'intérieur d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii* incluant le noyau (N) avec son nucléole (NU), les deux flagelles (F), le chloroplaste adjacent à la membrane plasmique (C) contenant un photorécepteur (E) et un ou plusieurs pyrenoïdes (P), des mitochondries (M), l'appareil de Golgi (G), des amyloplastes (S) et la vacuole (V). Adopté de Harris, Stern et al. (2009).

1.3.●● Développement biotechnologique de *Chlamydomonas reinhardtii*

Depuis sa première transformation en 1988, le nombre de ressources génomiques disponibles pour exploiter *C. reinhardtii* a exponentiellement augmenté (Figure 1.3) (Scaife, Nguyen et al. 2015). Parmi celles-ci, la création d'une collection publique de souches et de plasmides en 1979 (www.chlamycollection.org) a permis d'accélérer les études à partir de cette microalgue. L'une des principale avancée est que les génomes nucléaires, chloroplastique et mitochondrial ont été séquencés, dont plus de 19 500 gènes ont pu être annotés depuis (Merchant, Prochnik et al. 2007, Mussnug 2015). Le génome nucléaire en est maintenant à sa version 5.5 et est complété à 93% (Blaby, Blaby-Haas et al. 2014). Plusieurs méthodes sont maintenant disponibles afin de transformer les trois génomes, soient à partir de billes de verre (Kindle 1990), par électroporation (Shimogawara, Fujiwara et al. 1998) ou via la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar, Misquitta et al. 2004). La communauté de chercheurs a aussi développé un éventail de gènes de sélection via la résistance à un antibiotique ou à un herbicide ou par complémentation auxotrophique (Tableau 1.1). En résumé, grâce à sa facilité à être cultivée en laboratoire, à son taux de croissance rapide et au nombre grandissant d'information sur sa biologie, *C. reinhardtii* a rapidement été reconnue pour son potentiel biotechnologique.

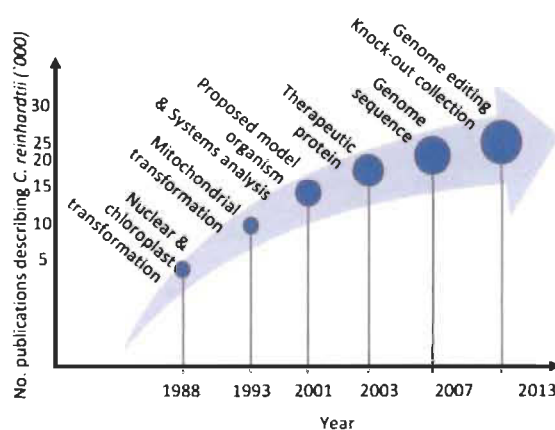


Figure 1.3 Évolution de *Chlamydomonas reinhardtii* comme organisme modèle en biotechnologie végétale. Adopté de Scaife, Nguyen et al. (2015)

Tableau 1.1

Liste des marqueurs de sélection actuellement disponibles pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*

Type de marqueur de sélection	Gène de sélection	Protéine codé	Mode de sélection	Référence
<i>Résistance à un antibiotique</i>	<i>BLE</i>	Protéine de liaison à la Phléomycine	Résistance à la Zéocine/Phleomycine	Stevens, Purton et al. (1996)
	<i>aphVII</i>	Aminoglycoside 3'-phosphotransférase	Résistance à la Paromomycine	Sizova, Fuhrmann et al. (2001)
	<i>aph7</i>	Aminoglycoside phosphotransférase	Résistance à l'Hygromycine	Berthold, Schmitt et al. (2002)
	<i>aadA</i>	Aminoglycoside 3'-adényltransférase	Résistance à la Spectinomycine/Streptomycine	Cerutti, Johnson et al. (1997)
	<i>npt2</i>	Néomycin phosphotransférase	Résistance à la Néomycine	Hall, Taylor et al. (1993)
	<i>CRYI-1</i>	Protéine ribosomale cytosolique S14	Résistance à l'Emetine	Nelson, Savereide et al. (1994)
	<i>tetX</i>	Oxidoreductase NADP dépendante	Résistance à la tétracycline	Garcia-Echauri and Cardineau (2015)
<i>Résistance à un herbicide</i>	<i>GAT</i>	Glyphosate aminotransférase	Résistance au Glyphosate	J., Daniel et al. (2014)
	<i>ALS</i>	Acétolacetate synthase	Résistance au Sulfometuron méthyl	L., Jun et al. (2002)
<i>Complémentation auxotrophique</i>	<i>NIT1</i>	Nitrate réductase	Croît en présence de Nitrate (<i>C. reinhardtii nit1-</i>)	Kindle, Schnell et al. (1989)
	<i>ARG7</i>	Argininosuccinate lyase	Croît en absence d'Arginine (<i>C. reinhardtii arg7-</i>)	Debuchy, Purton et al. (1989)
	<i>NIC7</i>	Quinolate synthase	Croît en absence de Nicotinamide (<i>C. reinhardtii nic7-</i>)	Ferris (1995)
	<i>OEE1</i>	Oxygen-evolving enhancer protein I	Permet l'autophototrophie (<i>C. reinhardtii oee1-</i>)	Mayfield and Kindle (1990)

Adopté de Doron, Segal et al. (2016)

1.4 Le génome nucléaire

Au cours des 10 dernières années, les outils génétiques permettant l'expression hétérologue à partir des génomes chloroplastiques et nucléaires de *Chlamydomonas reinhardtii* se sont beaucoup développés. Néanmoins, les meilleurs rendements de production de protéines hétérologues ont été obtenus à partir du génome chloroplastique avec des rendements de 10% des protéines totales (Wecker, Meuser et al. 2011). Ceci est dû, en grande partie, au fait que l'intégration des transgènes s'effectue par recombinaison homologue (Fischer, Stampacchia et al. 1996). Cette caractéristique propre à ce génome permet de cibler un locus hautement exprimé. Cependant les protéines produites à partir du chloroplaste y sont confinées et leur accumulation peut, dans certains cas, causer un stress ou même la mort de la cellule. De plus, le chloroplaste ne possède pas les enzymes et la machinerie nécessaire pour la modification post-traductionnelle, soit un processus essentiel pour le bon fonctionnement de plusieurs protéines de voies métaboliques chez les cellules végétales (León-Bañares, González-Ballester et al. 2004, Friso and van Wijk 2015). Dans une perspective de biologie synthétique où l'on désire envoyer une enzyme hétérologue biologiquement fonctionnelle dans un autre compartiment cellulaire afin d'y reconstruire une voie métabolique, l'utilisation du chloroplaste représente une réelle limitation. Au contraire, les protéines exprimées à partir du génome nucléaire peuvent, via des séquences de signalisation, être dirigées vers les organelles désirées ou même être sécrétées hors de la cellule, ce qui peut grandement simplifier les processus de purification subséquents (Figure 1.4). De plus, les protéines hétérologues issues du génome nucléaire peuvent accéder au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi où elles pourront subir plusieurs modifications post-traductionnelles dont la glycosylation (Mathieu-Rivet, Scholz et al. 2013). C'est en considérant ces avantages que l'utilisation du génome nucléaire suscite de plus en plus d'intérêt auprès de la communauté de chercheurs désirant exploiter *C. reinhardtii* comme plateforme de production hétérologue de composés végétaux à haute valeur.

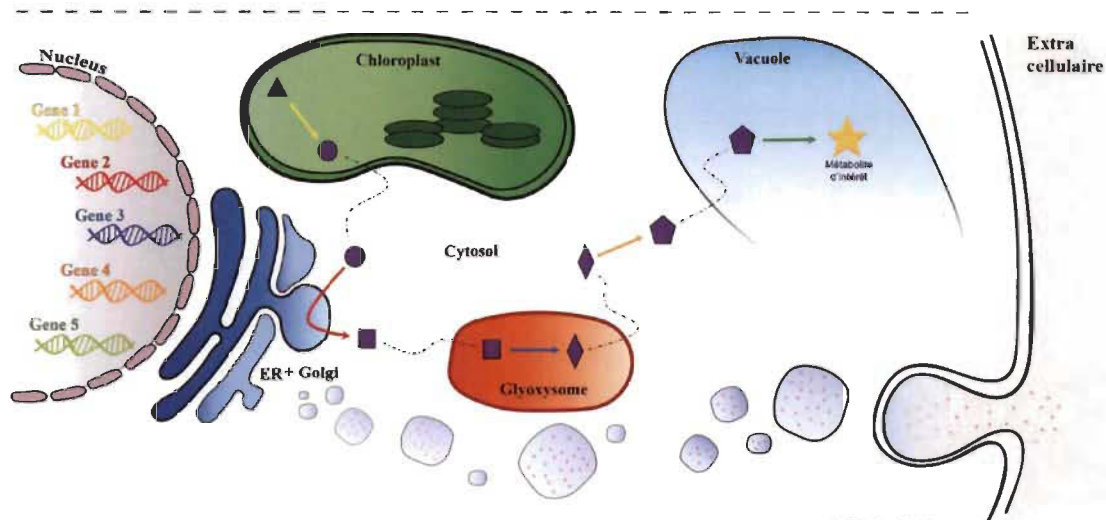


Figure 1.4 Principal avantage de l'utilisation du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* en biologie synthétique. Les protéines hétérologues produites à partir du génome nucléaire peuvent être envoyées dans les différents compartiments cellulaires de la cellule de *C. reinhardtii* afin d'effectuer leur rôle catalytique de la voie métabolique d'intérêt. Les flèches représentent les étapes enzymatiques d'une voie métabolique hypothétique pour la production d'un métabolite d'intérêt. Leur couleur est associée à ceux des transgènes intégrés dans le génome nucléaire.

1.4.1 Les limitations du génome nucléaire

Bien que l'exploitation du génome nucléaire pour l'expression de transgènes présente plusieurs avantages, celui-ci possède certaines limitations qui rendent difficile l'obtention de haut niveau d'expression des transgènes. Le génome nucléaire de *C. reinhardtii* présente un pourcentage GC élevé, soit de 64% (Merchant, Prochnik et al. 2007). Premièrement, ce haut niveau GC contribue à augmenter le niveau de compaction de la chromatine (hétérochromatine), ce qui provoque l'inactivation de la transcription du transgène. Deuxièmement, ce % GC élevé réduit la compatibilité des transgènes non natifs ce qui peut aussi affecter leur expression (Cerutti, Johnson et al. 1997, Barahimipour, Strenkert et al. 2015). Il a été clairement démontré que l'expression transgénique à partir du noyau de *Chlamydomonas reinhardtii* est amputée par des mécanismes de "gene silencing" tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel (Cerutti, Johnson et al. 1997, Schroda 2006, Cerutti, Ma et al. 2011). Contrairement au

génomique chloroplastique, l'intégration d'un brin d'ADN exogène s'effectue par recombinaison non homologue via le mécanisme de jonction des extrémités non homologues (Debuchy, Purton et al. 1989, Kindle 1990, Kumar, Falcao et al. 2013). Cette intégration aléatoire dans le génome nucléaire engendre donc de la variation des niveaux d'expression entre les clones transformés à partir d'une même cassette d'expression. Ce phénomène est appelé "*position effect*" et il est dû au fait que les transgènes s'incorporent aléatoirement dans des régions du génome plus ou moins exprimées (Grigliatti and Mottus 2001). Expérimentalement, ce phénomène implique qu'il faut cribler plusieurs transformants avant d'en trouver un qui possède un niveau d'expression soutenable. Ces manipulations de criblage sont bien souvent longues, laborieuses et coûteuses, ce qui représente un frein pour la manipulation du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. En résumé, bien qu'il y ait un réel intérêt pour l'exploitation du noyau de *C. reinhardtii* en biologie synthétique, la communauté de chercheurs manque toujours à obtenir de hauts niveaux d'expression et leurs travaux sont entravés par de fastidieux processus de criblage.

1.5 Le but du projet de recherche

Avec l'idée d'accroître la liste d'outils génétiques disponibles pour la manipulation du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*, notre but ultime est tout d'abord d'améliorer le processus de sélection des transformants de meilleure qualité. Nous présentons donc un nouveau système de criblage colorimétrique et semi-quantitatif qui permet d'identifier, rapidement et directement sur leur milieu de culture solide, les colonies d'algues positives avec les meilleurs niveaux d'expression transgénique. Notre système de criblage ne nécessite aucun composé chimique ou instrument coûteux et ne requiert aucune manipulation supplémentaire, ce qui le rend accessible et facile d'utilisation. En parallèle, nous avons comme défi d'offrir à notre construction un niveau d'expression optimal. Pour ce faire, nous avons utilisé les plus récents et performants outils moléculaires disponibles dans la littérature de *C. reinhardtii*. Notre cassette d'expression utilise un système d'expression bicistronique via un court peptide autocatalytique. Celle-ci a aussi spécialement été imaginée afin de facilement insérer un gène d'intérêt (GOI) et un gène

rappporteur à l'aide de sites de restriction. Dans un premier temps, notre nouveau système de criblage, permettra d'accélérer les manipulations génétiques à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Dans un deuxième temps, notre vecteur d'expression robuste et versatile représentera un outil génétique de base pour la construction d'une voie métabolique hétérologue et contribuera à atteindre le potentiel industriel de *C. reinhardtii* à titre de plateforme de production de biomolécules d'origine végétale.

1.6 Le système de criblage

Les termes système de sélection et de criblage sont parfois confondus ou mal compris. Premièrement, le système de sélection fait référence à une plateforme exploitant une barrière sélective afin de permettre l'unique croissance des clones présentant un avantage de survie. Selon l'organisme hôte, les systèmes de sélection utilisent souvent des gènes de résistance à certains antibiotiques ou herbicides (voir tableau 1.1). Deuxièmement, le système de criblage (*screening system*) permet de mesurer l'activité d'une enzyme ou d'un processus biologique désiré chez un organisme donné (Reetz 2016). Dans plusieurs cas, la quantification *in vivo* de ces processus nécessite plusieurs analyses difficiles et coûteuses à réaliser. Dans ce sens, les systèmes de criblage sont des outils qui ont grandement contribué à faciliter ce type d'étude et ils sont maintenant exploités dans plusieurs domaines en biologie. Les systèmes de criblage exploitent couramment des gènes rapporteurs. Majoritairement, les gènes rapporteurs codent pour des protéines qui sont facilement quantifiables par diverses méthodes d'imagerie. En génie génétique, les gènes rapporteurs peuvent être utilisés pour rapidement évaluer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt. Par exemple, en assumant que la quantité de protéines hétérologues est proportionnelle à l'expression du gène qui la code, les chercheurs ont compris qu'en fusionnant une protéine fluorescente à la protéine d'intérêt, il serait possible de quantifier, par spectrofluorimétrie, son niveau d'expression (Soboleski, Oaks et al. 2005). Sachant que la fusion d'une telle protéine à une autre protéine d'intérêt peut parfois modifier son activité ou ses performances catalytiques, il n'est pas préférable d'utiliser ce type de système lorsque l'activité biologique de la protéine d'intérêt est importante. Il existe aussi les gènes rapporteurs de type enzymatique. C'est-à-dire qu'ils

codent pour des enzymes dont la réaction qu'elle catalyse est aussi quantifiable à l'aide d'un instrument d'imagerie. Cependant, dans la plupart des cas, ce type de gène rapporteur ne peut être fusionné à une protéine d'intérêt. Chez *Chlamydomonas*, plusieurs gènes rapporteurs sont disponibles et ont, entre autres, été testés pour mesurer l'efficacité de différentes cassettes d'expression à partir du génome nucléaire (Tableau 1.2).

Récemment, il a été démontré qu'il était possible de faire fonctionner des peptides autocatalytiques viraux chez *C. reinhardtii* pour construire une cassette d'expression bicistronique (Rasala, Lee et al. 2012). En d'autres mots, les auteurs ont séparé, par un court peptide auto-clivable, un gène de sélection et un gène rapporteur. Cette construction a permis de former distinctement deux protéines à partir du même ARNm. Similairement, en remplaçant le gène de sélection par un gène d'intérêt, il est maintenant possible d'utiliser tous les types de gènes rapporteurs pour mesurer le niveau d'expression de ce dernier, sans affecter son activité catalytique ou biologique. Ceci est particulièrement souhaitable en ingénierie métabolique chez *Chlamydomonas* puisque les niveaux d'expression entre les transformants sont variables et puisqu'il est difficile de mesurer l'activité enzymatique d'une protéine d'intérêt *in vivo*. Comme il a été mentionné plus tôt, le design de notre cassette d'expression a été spécifiquement réalisé selon une perspective d'utilisation en biologie synthétique. Dans cet ordre d'idée, sachant que les gènes d'intérêt qui seront exploités correspondront à des enzymes de voie métabolique, nous avons volontairement axé le choix de notre gène rapporteur vers une enzyme. En supposant que les deux enzymes, soient l'enzyme d'intérêt et l'enzyme rapporteuse, subissent les mêmes mécanismes de modification post-traductionnelle dans la cellule, cela permet d'offrir une meilleure représentation de l'activité biologique du gène d'intérêt via le gène rapporteur.

Tableau 1.2

Liste des gènes rapporteurs actuellement disponibles pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*

Gène rapporteur	Protéine codé	Note	Référence
mTagBFP	Protéine bleu fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690 et cw15	Rasala, Barrera et al. (2013)
CFP	Protéine cyan fluorescente	Souche UVM11	Lim (2013)
mCerulean	Protéine cyan fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690 et UVM4	Rasala, Barrera et al. (2013), Lauersen, Kruse et al. (2015)
GFP	Protéine verte fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690	Fuhrmann, Oertel et al. (1999), Rasala, Barrera et al. (2013)
Clover	Protéine verte fluorescente	Codon optimisé; Souche UVM4	Lauersen, Kruse et al. (2015)
Venus	Protéine jaune fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690 et UVM4	Rasala, Barrera et al. (2013), Lauersen, Kruse et al. (2015), Onishi et Pringle (2016)
YFP	Protéine jaune fluorescente	Non codon optimisé; Souche UVM4 et UVM11	Neupert, Karcher et al. (2009), Blaby-Haas, Page et al. (2018)
tdTomato	Protéine orange fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690	Rasala, Barrera et al. (2013)
mRuby2	Protéine rouge fluorescente	Codon optimisé; Souche UVM4	Lauersen, Kruse et al. (2015)
mCherry	Protéines rouge fluorescente	Codon optimisé; System ble-2A; Souche cc1690	Rasala, Barrera et al. (2013), Scranton, Ostrand et al. (2016), Molino, de Carvalho et al. (2018)
rluc	Luciférase	Provenant de <i>Renilla reniformis</i> ; Codon optimisé; Peptide signal ARS2; Souche cw15	Fuhrmann, Hausherr et al. (2004), Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. (2009)
gluc	Luciférase	Provenant de <i>Gaussia princeps</i> ; Codon optimisé; Peptide signal CAH1; Souche cc1883, ccw15 et UVM4	Ruecker, Zillner et al. (2008), Shao et Bock (2008), Lauersen, Berger et al. (2013)
GUS	β -Glucuronidase	Souche cc-125; Transfecté par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pratheesh, Vineetha et al. (2014)
ARS2	Arylsulfatase	Endogénique à <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Davies, Weeks et al. (1992), Specht, Nour-Eldin et al. (2015), Blaby et Blaby-Haas (2018)

Tableau 1.2 - Suite

Gène rapporteur	Protéine codé	Note	Référence
Fd-hyd	ferredoxin–hydrogénase	Codon optimisé; Lié par un Liker synthétique; Transfecté dans un souche mutante <i>hydA</i> déficiente; Utilise le système de détection par <i>Rhodobacter capsulatus</i> Wecker, Meuser et al. (2011)	Weiner, Atar et al. (2018)
XYN1	Endo- β -1,4-xylanase	Codon optimisé; System ble-2A; Peptide signal ARS1; Exprimé par Rasala, Lee et al. (2012) mais n'a pas été utilisé comme gène rapporteur mais plutôt comme gène d'intérêt.	Ce projet de recherche

Adopté de Jinkerson et Jonikas (2015)

1.6.1 *La xylanase comme gène rapporteur*

Les xylanases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β -1,4 des polysaccharides de xylan pour former des xylo-oligosaccharides et des D-xylose (Figure 1.5). Le xylan est une molécule hémicellulosique formant une chaîne complexe de monomères de xylose qui est abondamment présent dans les parois cellulaires et dans la lamelle moyenne des cellules végétales, faisant de lui le second polysaccharide le plus abondant après la cellulose (M. L. T. M. Polizeli 2005). Dans la nature, plusieurs espèces de procaryotes et d'eucaryotes ont la capacité de produire des xylanases afin d'utiliser le xylan comme source de carbone. On retrouve les endo- β 1,4-xylanase chez certains champignons, bactéries, levures, algues marines, protozoaires, crustacés, insectes, etc. Depuis quelques années, l'exploitation de microorganismes pour la production industrielle de xylanase a connu beaucoup de succès. Les endoxylanases sont désormais largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire, du textile et papetière (Walia, Guleria et al. 2017).

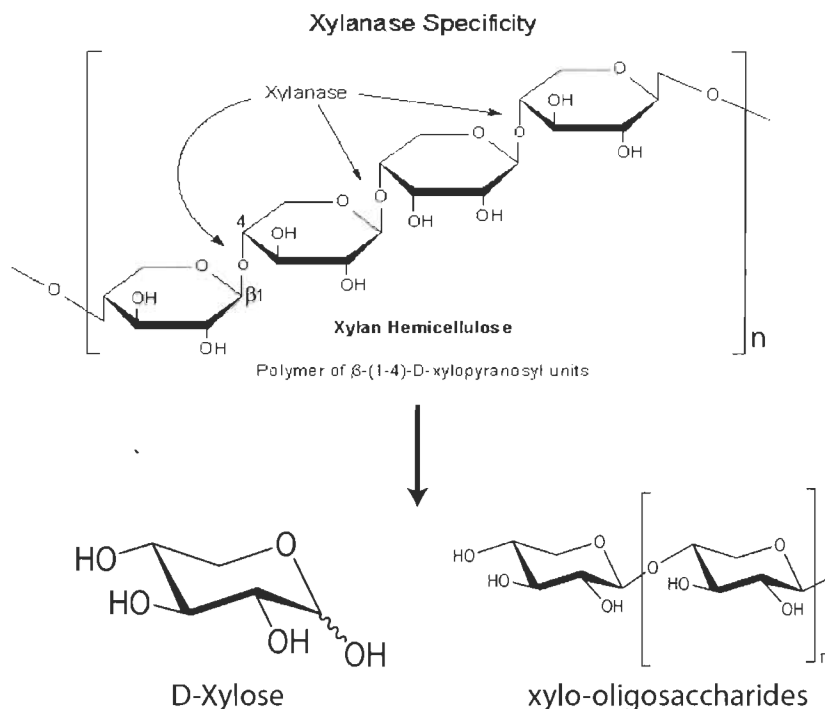


Figure 1.5 Schématisation de la réaction d'hydrolyse des liaisons β 1,4 du xylane par l'endo- β 1,4-xylanase. Images adoptés de Sigma-Aldrich®.

En plus d'offrir une valeur ajoutée à notre cassette d'expression, la xylanase peut être utilisée à titre de gène rapporteur. En effet, à des fins industrielles, plusieurs méthodes ont été développées afin d'identifier rapidement des microorganismes sécrétant l'endo-1,4- β -xylanase. Parmi celles-ci, l'une des méthodes communément utilisée est l'essai enzymatique à partir d'un substrat chromogénique soluble (Biely, Mislovičová et al. 1985). Isolé à partir du bois de plage, le substrat 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-Xylane (xylane de bois de plage) est couplé de manière covalente au colorant réactif Remazol Brilliant Blue R (RBB) (Biely, Mislovičová et al. 1988). La forme conjuguée de ces deux composés est abrégée par RBB-xylane et se retrouve sous forme de poudre colorée bleu. Lorsqu'il est introduit dans le milieu de culture gélosé, le RBB-xylane offre une détection colorimétrique rapide et peu coûteuse des microorganismes sécrétant la xylanase. Cette méthode de sélection a notamment été utilisée pour identifier plusieurs espèces de champignons et de bactéries sécrétant naturellement la xylanase (Yoon, Park et al. 2007, Meddeb-Mouelhi, Moisan et al. 2014).

Dans le cadre de ce projet de recherche, notre stratégie est d'appliquer ce système de criblage pour le génie génétique à partir de *Chlamydomonas*. Nous souhaitons donc produire, de manière hétérologue, la xylanase I (XYN1) (P36218) native au champignon filamentueux *Trichoderma reesei* à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*. XYN1 est une endo-1, 4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) de 19 kDa et possède un pH optimum de 3,5 - 4,0, un point isoélectrique (pI) de 5,2 et est stable entre les pH 2,5 et 8,5 à température pièce (Torronen, Mach et al. 1992, Torronen et Rouvinen 1995). Sachant que les paramètres physicochimiques de XYN1 sont compatibles avec les conditions de croissance de *C. reinhardtii*, il semble intéressant d'utiliser cette enzyme comme gène rapporteur. D'autres chercheurs ont employé ce même système colorimétrique pour détecter l'expression hétérologue d'une xylanase bactérienne (*Clostridium thermocellum*) à partir des exudats racinaires et du fluide de guttation de *Nicotiana tabacum* L. (Borisjuk, Borisjuk et al. 1999, Komarnytsky, Borisjuk et al. 2000). De plus, Rasala et son équipe ont déjà réussi à exprimer et sécréter de manière fonctionnelle la xylanase I de *T. reesei* à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii* (Rasala, Lee et al. 2012). Plus récemment, d'autres chercheurs ont utilisé une xylanase bactérienne (Xyn1HB) comme gène rapporteur à partir de *S. cerevisiae* (Fang, Wang et al. 2017). Ils ont pu rapidement sélectionner les transformants en fonction de l'apparition de halo sur une gélose supplémentée en RBB-Xylane. Ces informations permettent donc de croire qu'il serait possible d'adapter ce système de détection sur pétri pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*.

En résumé, en complétant les géloses TAP (Tris-Acétate-Phosphate) avec du RBB-xylane, celles-ci obtiendront une coloration bleue. Théoriquement, les colonies d'algues positives qui exprimeront notre transgène, seront celles qui sécréteront la xylanase dans leur milieu extracellulaire, soit directement dans la gélose. De par la présence de son substrat, la xylanase recombinante sera en mesure de catalyser l'hydrolyse du RBB-xylane, ce qui se traduira par l'apparition de zone de lyse claire. Puisque nous utilisons un système d'expression bicistronique (*GOI-2A-XYN1*), c'est à dire que le gène d'intérêt (*GOI*) et le gène rapporteur (*XYN1*) sont générés à partir du même ARNm et donc sous le contrôle du même promoteur, il est possible d'affirmer que la production de xylanase sera proportionnelle à celle de la protéine d'intérêt. Dans cet ordre d'idée, il sera

possible de déterminer visuellement et semi-quantitativement, les colonies positives transformées exprimant davantage notre transgène en fonction de la taille du cercle de dégradation qu'elles présentent (Figure 1.6).

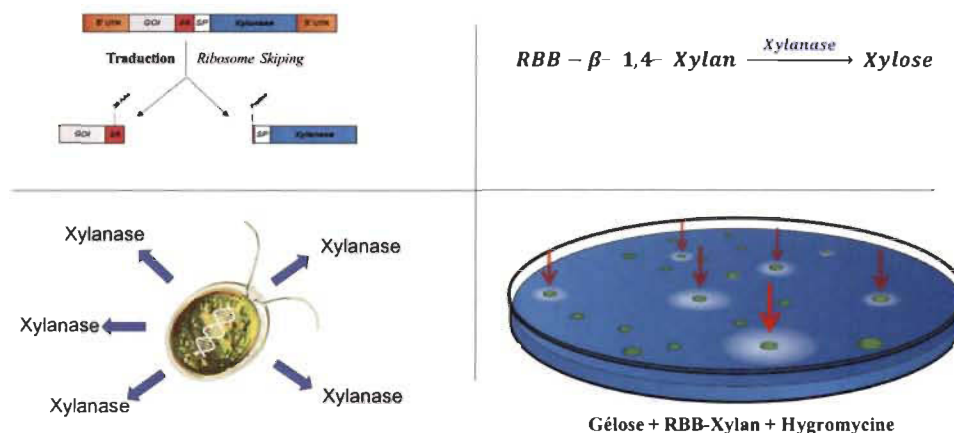


Figure 1.6 Schématisation du système de criblage sur gélose RBB-xylane des colonies transformées de *C. reinhardtii* exprimant davantage notre transgène.

1.6.2 Mécanisme biochimique du système de criblage

Les colorants réactifs (*reactive dyes*) sont des molécules chromogéniques possédant un ou des groupements chimiques capables de former un lien covalent avec un site nucléophile d'un substrat fibreux (Lewis 2011). Ces types de colorants sont beaucoup utilisés dans l'industrie du textile. Il existe une grande diversité de colorants réactifs et ceux-ci sont catégorisés selon leur groupe fonctionnel impliqué dans l'interaction covalente avec la fibre cellulosique. Le colorant réactif utilisé pour la coloration du xylane est le Remazol Brillant Blue R (*Reactive Blue 19*) (Figure 1.7). Le RBB est un colorant réactif contenant une anthraquinone qui est impliqué dans sa coloration bleue. En fait, le RBB est un colorant spécial puisque sous sa forme originale, celui-ci n'est pas considéré comme réactif puisqu'il présente aucun groupement chimique capable de former une liaison covalente avec un site nucléophile d'un substrat tels que la cellulose ou le xylane. Pourtant, le RBB est classé dans les colorants vinylsulphones puisqu'il possède un vinylsulphone ($C_4H_6O_2S$) masqué qui est impliqué dans l'interaction covalente avec le xylane. On dit qu'il est masqué puisque sous sa forme chimique originale, le RBB ne

possède pas le groupement (vinylsulphone). Celui-ci est masqué par le groupement acide sulfonique (SO_3Na) qui permet au RBB d'être soluble.

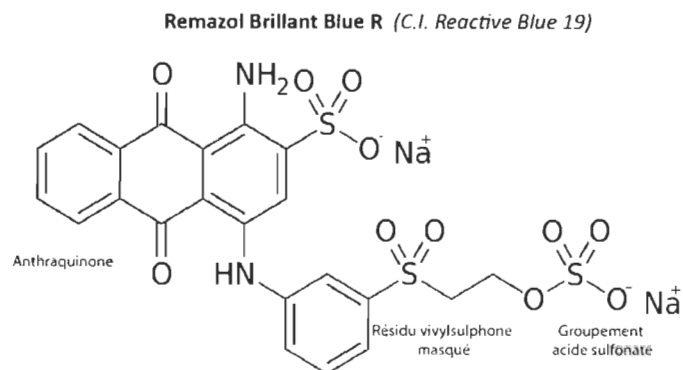


Figure 1.7 Formule chimique du colorant réactif Remazol Brilliant Blue R. En bleu, l'hydrocarbure aromatique polycyclique anthraquinone; En jaune, le résidu vinylsulphone ; En vert le groupement acide sulfonate.

Afin de rendre le RBB réactif, celui-ci doit subir des manipulations. Tout d'abord, lors du couplage entre le xylane et le RBB, du NaOH et du sodium acétate (NaOAc) sont ajoutés dans la solution afin de rendre le milieu alcalin. Dans cette condition, le sodium acétate sert tout d'abord à neutraliser les groupements acide sulfonate du RBB. Le NaOH, quant à lui, augmente le pH ce qui permet également de déprotomer les groupements hydroxyl du deuxième ou troisième carbone des monomères du xylane pour ainsi créer une liaison libre sur l'atome d'oxygène. Celui-ci représente donc le site nucléophile permettant aux molécules de RBB de se lier de manière covalente sur le xylane (Figure 1.8A). Parallèlement, la base conjuguée OH^- du NaOH va réagir avec un hydrogène du groupement vinyl sulphone masqué dans le RBB (représenté en jaune à la figure 1.7). Cette réaction va ensuite permettre de libérer le groupement acide sulfonique via une réaction d'élimination 1,2 trans (Figure 1.8B) et ensuite former un groupement vinylsulphone qui lui, est très réactif. L'atome d'oxygène nucléophile du xylane va finalement former une liaison covalente C-O avec le groupement vinylsulphone via une réaction d'addition Michaelienne (Figure 1.8B) (Lewis 2011).

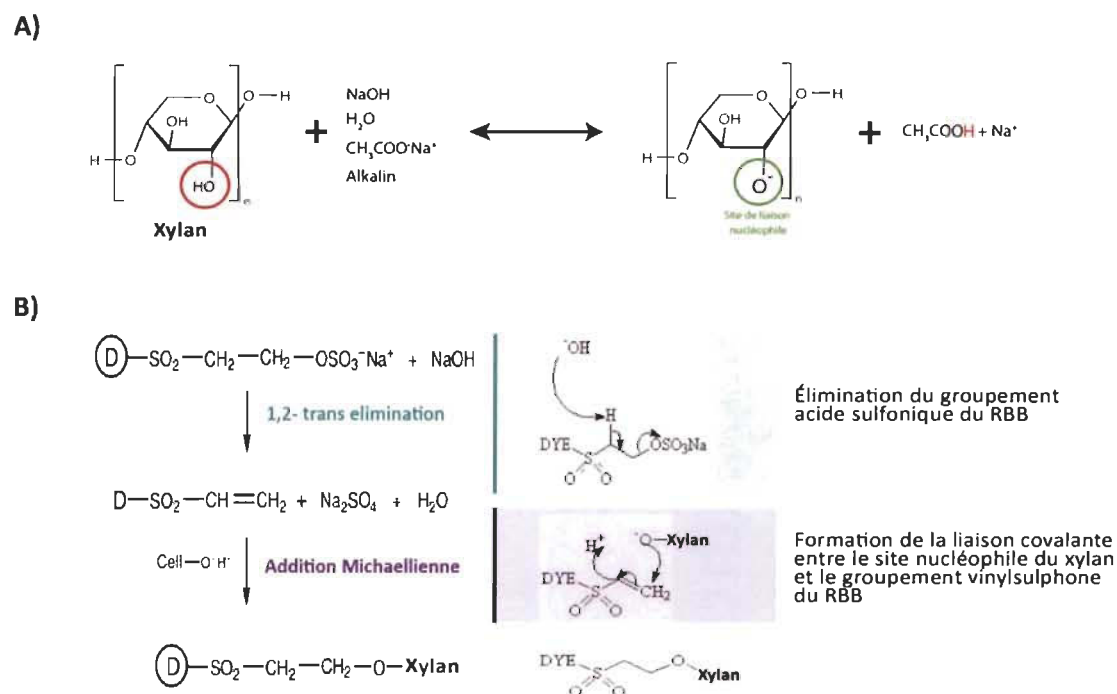


Figure 1.8 **Processus chimique de la formation de la liaison covalente entre le colorant réactif Remazol Brilliant Blue R et la molécule de xylane.** A) Préparation du site de liaison nucléophile du groupement hydroxyle du Xylane. B) Réactions chimiques nécessaires pour rendre le RBB réactif. Le cercle avec la lettre D fait référence au colorant. Images adaptées de Lewis (2011)

Contrairement à ce qu'il pourrait être supposé, le principe derrière la formation des cercles de dégradation translucides sur la gélose RBB-Xylane n'est pas causé par une décoloration du RBB. Le xylane est une longue chaîne de monomères de xylose. De par son haut poids moléculaire, la molécule de xylane n'est pas en mesure de diffuser dans le milieu gélosé. Cependant, l'hydrolyse du RBB-Xylane par la xylanase produit des monomères de RBB-xylose à faible poids moléculaire qui sont, eux, en mesure de diffuser dans le milieu de culture gélosé. Les molécules RBB-xylose, en diffusant vers les régions de la gélose moins concentrées, provoquent le déplacement radial du colorant bleu. Ce phénomène tend donc à réduire la quantité de colorant autour des colonies productrices de xylanase ce qui se traduit par l'apparition d'une zone claire (halo). Cette diffusion du RBB-xylose explique aussi le front bleu foncé observé au pourtour du halo. Ce front bleu foncé est causé par l'augmentation de la concentration de colorant bleu dû à la superposition localisée du RBB-Xylane et du RBB-Xylose.

1.7 Outils moléculaires

Pour la construction de leurs cassettes d'expression, les chercheurs ont désormais accès à différents éléments régulateurs tels que des promoteurs inductibles ou constitutifs, des introns, des 3' et 5' *UTR*, des signaux de localisation et plus encore. Afin de maximiser l'expression de notre cassette d'expression, nous avons, au meilleur de nos capacités, tenté de puiser parmi ces meilleurs éléments. Parmi ceux-ci, on y retrouve les éléments régulateurs natifs à *C. reinhardtii* tels que le promoteur chimérique *HSP70/RBC2*, les régions non traduites 5' et 3' et les introns du gène *RBCS2*. Afin de réaliser une cassette bicistronique, nous avons utilisé le peptide viral FMDV 2A allongé. De plus, le peptide signal endogénique ayant été utilisé pour permettre à la xylanase d'emprunter la voie de sécrétion est celui du gène de l'arylsulfatase (*ARSI*). Les raisons qui appuient le choix de chacun de ces éléments seront discutées dans le prochain chapitre. Un autre outil qui a été exploité lors de la conception de notre cassette d'expression est l'optimisation des codons de la séquence codante (CDS) du gène de la xylanase. Finalement, comme il a été mentionné plus tôt, il existe désormais une panoplie de souches de *Chlamydomonas reinhardtii* disponibles. Parmi celles-ci, la souche *uvm4* qui a été mutée par rayonnement UV est reconnue pour offrir des niveaux d'expression de transgènes plus élevés. C'est principalement pour cette raison que cette souche a été sélectionnée pour nos travaux.

1.8 Choix de la souche *uvm4*

Afin de surmonter la problématique d'extinction de gène (*gene silencing*) des transgènes à partir du génome nucléaire, Neupert, Karcher et al. (2009) ont réussi à générer une nouvelle souche (*uvm4*) démontrant des niveaux d'expression supérieure. Dans leurs études, Neupert et son équipe ont initialement utilisé la souche *cw15 arg7-*. Cette souche correspond à une souche mutante possédant une paroi cellulaire affaiblie (Davies 1971). De plus, son gène *arg7* codant pour la argininosuccinate lyase a été supprimé ce qui lui permet de croître uniquement sur un milieu enrichi en arginine. Les mêmes chercheurs ont co-transformé *cw15 arg7-* avec le gène de résistance à l'émétine (*CRYI-1*), un inhibiteur traductionnel, et le gène de sélection *ARG7*. Ils ont premièrement sélectionné les colonies sur un milieu dépourvu d'arginine et ensuite en fonction de la présence

d'émétine. Le niveau d'expression du gène de résistance à l'émétine est proportionnel à la concentration que le transformant sera capable de tolérer. Ils ont donc sélectionné un transformant exprimant faiblement *CRYI-1*, donc faiblement résistant à l'émétine, afin de poursuivre leurs études. Cette souche a été appelée Elow45 (emetine low resistant no.45). C'est à partir de Elow45 que Neupert et son équipe ont réussi à générer, par mutagenèse aléatoire, la souche uvm4 qui s'est vu offrir la résistance à l'émétine la plus élevée, soit plus de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Depuis leur publication, la souche uvm4 est reconnue comme l'une des souches offrant les meilleurs niveaux d'expression de transgène à partir du génome nucléaire (Lauersen, Berger et al. 2013, Kong, Yamasaki et al. 2015).

Puisque la souche uvm4 provient de la souche cw15, celle-ci possède elle aussi une paroi cellulaire déficiente. Or, il a été démontré que les souches sans parois cellulaires ou simplement affaiblies tel que cw15 intègrent plus facilement les transgènes par électroporation (Azencott, Peter et al. 2007). L'utilisation de cette souche dans notre laboratoire représente donc un avantage puisque c'est à partir de cette méthode que nous allons transférer notre transgène dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*.

1.9 Objectifs et hypothèses du projet de recherche

En fonction du but principal, qui est l'élaboration d'un nouveau système de criblage pour le génie génétique à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*, ce projet de recherche possède trois grands objectifs. Le premier vise à déterminer si le système de détection sur Pétri par la xylanase est compatible avec *C. reinhardtii*. Découlant de ce premier objectif, nos hypothèses sont les suivantes : 1) la croissance de *C. reinhardtii* ne sera pas inhibée par la présence de RBB-Xylane dans son milieu de culture. 2) *C. reinhardtii* ne sécrètera pas d'enzyme capable d'hydrolyser le RBB-xylane. 3) La xylanase sera en mesure d'hydrolyser le RBB-xylane présent dans une gélose TAP sous les conditions de croissance de *C. reinhardtii*. Afin d'adresser ces hypothèses, des tests de faisabilité seront effectués.

Le deuxième objectif est d'évaluer l'efficacité du système de criblage colorimétrique pour la détection des transformants positifs. Notre première hypothèse est que les colonies présentant un cercle de dégradation auront, dans 100% des cas, intégré de manière stable notre transgène. Ceci sera vérifié par PCR. Notre deuxième hypothèse est que les transformants qui seront sélectionnés exprimeront davantage notre transgène en fonction de la taille du cercle de dégradation qu'ils posséderont. Ceci sera vérifié par PCR quantitatif.

Finalement, le dernier objectif vise à optimiser le niveau d'expression de notre construction en y ajoutant un nouveau promoteur synthétique fort ainsi que tous les introns du gène *RBCS2*. Notre hypothèse est que les colonies transformées avec la cassette optimisée posséderont des plages de lyse de plus grande taille comparativement à ceux transformés avec la cassette d'expression de base.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Tests de faisabilité

Avant de débiter la démarche expérimentale à partir du vecteur d'expression utilisant la xylanase comme gène rapporteur, des tests de faisabilité ont été effectués afin de s'assurer que notre système de criblage est compatible avec *Chlamydomonas*. Pour y arriver, 3 questions fondamentales ont été posées. Premièrement, est-ce que la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* sur gélose TAP est affectée par la présence de RBB-Xylane ? Deuxièmement, est-ce que cette microalgue sécrète naturellement une enzyme similaire à celle de la xylanase qui provoquerait des cercles de dégradation autour des colonies ? Troisièmement, est-ce que l'enzyme de la xylanase est capable d'effectuer son activité catalytique avec une bonne sensibilité dans le milieu TAP gélosé ? Pour répondre à la première question, une quantité similaire de cellules d'algues a étéensemencée sur des géloses TAP normales et contenant 0,1% (m/v) de RBB-Xylane. La croissance des colonies a été qualitativement observée durant 6 jours selon les mêmes conditions environnementales. Concernant la deuxième question, la présence ou l'absence de cercles de dégradation autour des colonies d'algues matures ont été déterminées à l'œil nu et au binoculaire après 6 jours de croissances sur gélose TAP + 0,1% de RBB-Xylane. Finalement, pour la dernière question, une dilution en série de l'enzyme purifiée endo-1,4- β -Xylanease M1 (*Trichoderma viride*) a été déposée sur une gélose TAP + 0,1% RBB-xylane. Un volume de 10 μ l de chaque dilution a été déposé sur des paper Whatman #1 de 0,6 cm de diamètre afin de limiter la dispersion et l'évaporation du liquide à la surface de la gélose. Les géloses ont été incubées et observées après 30, 60, 120 minutes et 16 heures. Les différentes dilutions de xylanase pure utilisées pour cette expérience ont été diluées dans le même tampon que le fournisseur, soit 3,2 M d'ammonium sulfate. À titre de contrôle négatif, 10 μ l de 3,2 M d'ammonium sulfate ont donc été déposés sur une gélose TAP + 0,1% RBB-xylane.

2.2 Démarche expérimentale

Afin d'atteindre les objectifs finaux du projet de recherche, plusieurs étapes expérimentales ont été nécessaires. Dans le but de simplifier la compréhension, la figure 2.1 illustre, dans l'ordre chronologique, les différentes étapes qui ont été accomplies.

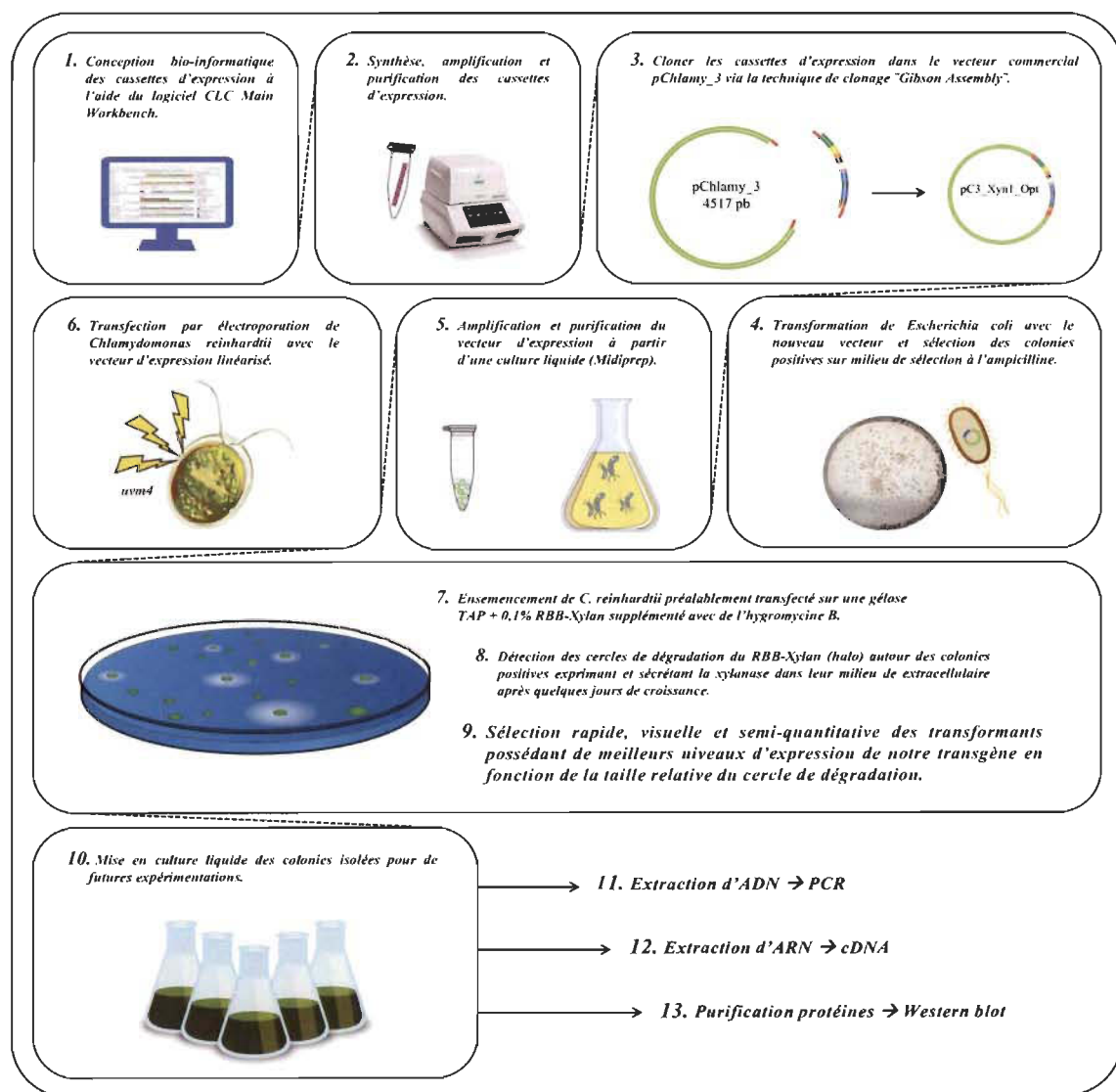


Figure 2.1 Schéma récapitulatif des différentes étapes expérimentales du présent projet de recherche.

2.3 Conception *in silico* des cassettes d'expression

La première étape a été de concevoir, par bio-informatique, les cassettes d'expression. Cette étape se doit d'être effectuée avec beaucoup d'attention et de précision puisque tous les résultats dépendront de l'intégralité et de la qualité de leurs séquences. De manière générale, la conception d'une cassette d'expression doit tendre à reproduire la structure naturelle des gènes de l'organisme cible. De cette manière, on s'assure que le transgène sera mieux reconnu par la machinerie génétique de l'hôte, ce qui offrira de meilleurs niveaux d'expression. Dans ce sens, l'ensemble des séquences qui a été utilisé pour concevoir nos transgènes a été minutieusement sélectionné et positionné selon le meilleur de nos connaissances de la génétique de *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'ensemble des séquences d'ADN a été manipulé à l'aide du logiciel CLC Main Workbench (Version 7.9.1) de QIAGEN. Les constructions pC3_Xyn1 et pC3_Xyn1_Opt ont rationnellement été conçues à partir de diverses séquences génétiques issues de la littérature du génie génétique de *C. reinhardtii* (Figure 2.2). La section suivante énumère chacun d'eux, tout en approfondissant sur leur origine et leur rôle dans la cassette d'expression.

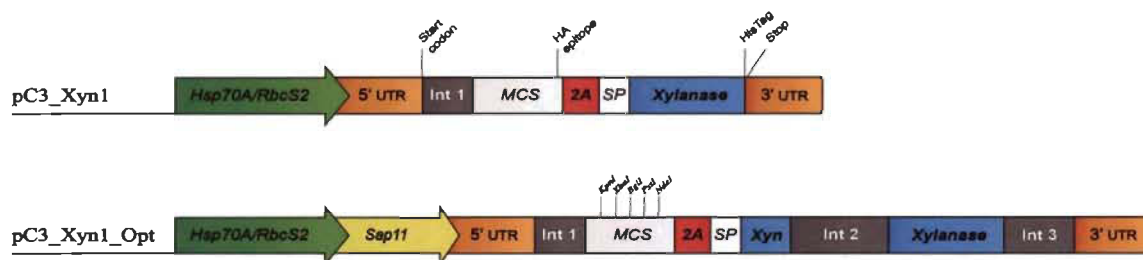


Figure 2.2 Schématisation des cassettes d'expression pC3_Xyn1 et pC3_Xyn1_Opt qui ont été conçues par bio-informatique.

2.3.1 Squelette de base du vecteur pChlamy_3

Le vecteur pChlamy_3 est un vecteur commercialisé par Invitrogen inclus dans le GeneArt® *Chlamydomonas* Engineering Kits. Ce vecteur est spécialement conçu pour faciliter l'expression de transgènes à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Celui-ci contient préalablement certains éléments génétiques qui ont été exploités dans nos

cassettes d'expression (Tableau 2.1). Dans ce sens, l'exploitation du vecteur pChlamy_3, à titre de squelette de base, nous a permis de simplifier et d'accélérer le processus de construction de notre vecteur d'expression pC3_Xyn1.

Tableau 2.1

Liste des éléments génétiques présents dans le vecteur commercial pChlamy_3

Éléments	Positions
Promoteur <i>HSP70/RBCS2</i> + 5' UTR (<i>RBCS2</i>)	70 - 565
Intron (<i>RBCS2</i>)	574 - 718
Multiple Cloning Site	728 - 770
3'UTR (<i>RBCS2</i>)	774 - 1007
Promoteur β 2-tubulin	1014 - 1326
Résistance à l'hygromycine B (<i>aph7</i>)	1327 - 2637
Résistance à l'Ampiciline (<i>bla</i>) *	2836 - 3696 *
Promoteur <i>bla</i> (P_{bla}) *	3697 - 3748 *
pUC ori	3794 - 4467

* *Brin complémentaire*

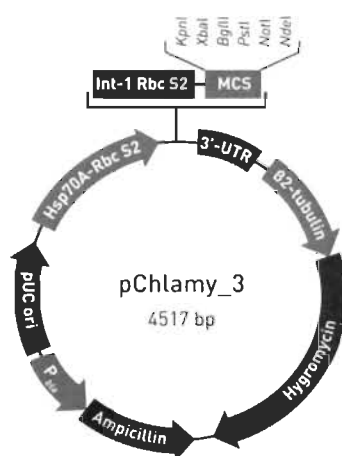


Figure 2.3 Carte schématique du vecteur commercial pChlamy_3. Tirée du guide d'utilisateur du GeneArt® *Chlamydomonas* Engineering Kits.

2.3.2 Promoteur *HSP70/RBCS2*

Lorsqu'on désire produire des protéines recombinantes, le choix du promoteur est sans aucun doute l'un des éléments les plus importants à considérer puisque celui-ci représente le site d'initiation de la transcription du transgène. Dans ce sens, l'obtention de hauts niveaux d'expression est possible grâce à l'utilisation de promoteurs constitutifs forts. Toutefois, encore aujourd'hui, l'une des principales limitations par rapport à l'expression de gènes hétérologues, à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii*, est l'absence de promoteurs forts (Scranton, Ostrand et al. 2016). Bien que l'exploitation de promoteurs hétérologues forts soit possible chez les *C. reinhardtii*, ceux-ci ne semblent pas offrir davantage d'expression que ceux natifs au génome de la microalgue (Díaz-Santos, Vega et al. 2013). Parmi les quelques promoteurs endogéniques constitutifs ayant été testés, le promoteur *RBCS2* contrôlant l'expression de la petite sous-unité de la Ribulose biphosphate carboxylase (RuBisCO) ainsi que le promoteur du gène *PsaD* codant pour une abondante protéine chloroplastique du photosystème I, sont ceux ayant été les plus largement utilisés (Kindle 1998, Fischer et Rochaix 2001, Rosales-Mendoza, Paz-Maldonado et al. 2012). Schroda, Blöcker et al. (2000) ont démontré qu'en fusionnant le promoteur endogénique *HSP70A* (Heat shock protein 70A) en amont du promoteur *RBCS2*, il était possible d'obtenir des niveaux d'expression d'un transgène significativement plus élevé. En étudiant par quel mécanisme d'action *HSP70A* agit, les mêmes auteurs ont conclu que celui-ci réduit dramatiquement la probabilité que le transgène subisse de l'extinction de gènes en diminuant localement la compaction de la chromatine (Schroda, Beck Christoph et al. 2002, Lodha et Schroda 2005). Par ailleurs, en exerçant des délétions dans les éléments *cis HSE* (Heat shock element) ainsi que dans la boîte TATA de la séquence promotrice *HSP70A*, les mêmes auteurs ont noté une réduction significative du niveau d'expression est engendré par *HSP70A/RBCS2*. Tout d'abord, il est proposé que la présence constitutive des Heat Shock Factor 1 (HSF1) liée au promoteur *HSP70A* favorise l'acétylation des histones H3/H4 en offrant ainsi à la chromatine un état activé. De plus, la présence d'une boîte TATA supplémentaire à proximité du promoteur *RBCS2* favoriserait le recrutement du complexe de pré-initiation Pol II (Lodha, Schulz-Raffelt et al. 2008, Strenkert, Schmollinger et al. 2013). Il a aussi été démontré que l'efficacité de transformation est significativement plus élevée lorsque

RBCS2 est fusionné avec *HSP70A* que lorsqu'il est employé seul (Schroda, Beck Christoph et al. 2002). Offrant de meilleurs niveaux d'expression transgéniques, le promoteur chimérique *HSP70A/RBCS2* est à ce jour reconnu comme étant le plus efficace et est désormais largement utilisé par la communauté scientifique (Doron, Segal et al. 2016).

Récemment, un nouveau promoteur entièrement synthétique et capable de conduire l'expression de transgène à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas* a été proposé. Ce dernier est issu d'une analyse bio-informatique des motifs *cis*- présents dans la séquence des 50 plus forts promoteurs constitutifs natifs à la microalgue. Ce promoteur synthétique a été nommé *SAP11* (synthetic algal promoter 11) et a été comparé au promoteur *HSP70/RBCS2* pour l'expression du gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente mCherry (Scranton, Ostrand et al. 2016). Ils ont mesuré significativement davantage de fluorescence de la mCherry à partir du promoteur *SAP11* comparativement au promoteur *HSP70/RBCS2*. Hypothétiquement, l'utilisation d'un promoteur synthétique est intéressant puisqu'il réduit les chances d'homologie avec d'autres promoteurs natifs qui subissent de l'extinction de gène. Comme il a été mentionné plus tôt, le promoteur *HSP70* agit tel un activateur transcriptionnel. En considérant cette particularité, il serait intéressant de positionner le promoteur *HSP70* en amont du promoteur *SAP11*.

2.3.3 5'UTR et 3'UTR du gène *RBCS2*

Chez les microalgues, lorsque l'on désire produire efficacement une protéine hétérologue à partir des génomes chloroplastiques, mitochondriales ou nucléaires, il est normalement avantageux d'utiliser des séquences régulatrices endogéniques provenant d'un gène naturellement fortement exprimé. Le promoteur *RBCS2*, par exemple, a initialement été sélectionné puisqu'il conduit l'expression de l'abondante protéine de la deuxième sous-unité de la RuBisCO est impliquée dans plusieurs processus biologiques essentiels tels que la photosynthèse, la photorespiration et la fixation du carbone. Dans cet ordre d'idée, afin de préserver une structure native à notre construction, les séquences des régions non traduites 5' et 3' du gène *RBCS2* ont été utilisées. Chez les eucaryotes, la présence des 5' et 3' *UTR* est primordiale puisqu'elle assure le bon fonctionnement de

plusieurs processus post-transcriptionnels. Ceux-ci sont globalement impliqués dans la localisation cytoplasmique, la stabilité et la traduction des ARNm (Pallier 2001). Similairement à la séquence Shine-Dalgarno chez les procaryotes, la région 5'UTR contient la séquence de Kozak qui est impliquée dans l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Cette séquence consensus est constituée d'une purine en position -3 et d'une guanine immédiatement en aval du codon d'initiation AUG (position +4). La séquence du 5'UTR du gène *RBCS2* employée dans nos constructions respecte donc cette caractéristique.

2.3.4 Introns 1, 2 et 3 du gène *RBCS2*

Contrairement au 5'UTR et 3'UTR, la présence d'introns dans une cassette d'expression eucaryotique n'est pas obligatoire pour réussir à obtenir l'expression d'un transgène. Toutefois, il a été initialement démontré que l'ajout de seulement une copie du premier intron du gène *RBCS2*, dans la séquence codante d'une cassette d'expression sous le contrôle du promoteur *RBCS2*, améliore significativement son niveau d'expression à partir du noyau (Lumbreras, Stevens David et al. 1998). Dans leur même article, Lumbreras et al. démontrent aussi que l'efficacité de cet intron est dépendante de sa position et qu'il semble contenir un élément activateur. Face à cette constatation, Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. (2009) ont mesuré les niveaux d'expression de la luciférase (*crLuc*) contenant les introns 1, 2 et 3 du gène *RBCS2* selon différentes positions, différents nombres de copies et tous sous le contrôle du promoteur *HSP70A/RBCS2*. Selon leurs résultats, il s'avère que l'incorporation des 3 introns du gène *RBCS2* en une seule copie organisée dans leur ordre physiologique est l'option offrant des niveaux d'expression supérieurs. En considérant ces résultats et que 88% des gènes présents dans le génome de *Chlamydomonas* possèdent des introns, il semble pertinent d'exploiter cette stratégie pour améliorer l'expression de notre transgène (Labadorf, Link et al. 2010). Puisque la séquence codante du vecteur d'expression pAES14 ayant été utilisée par Eichler-Stahlberg et al. (2009) fait une taille similaire à la nôtre, soit 1102 pb et 1059 pb respectivement, nous avons décidé de s'inspirer des positions des introns 1, 2 et 3 du gène *RBCS2* qu'ils ont utilisé. Tout d'abord, le premier intron est placé en aval du 5'UTR. En second lieu, l'intron 2 a été intégré directement à l'intérieur de la séquence codante de *XYNI*. Chez

Chlamydomonas, les séquences consensus des sites d'épissage 5' et 3' sont AG/GTGAG et TGCAG/GT, respectivement (Labadorf, Link et al. 2010, Weiner, Atar et al. 2018). Nous avons donc pris soin d'intégrer l'intron 2 à la position +739 qui reproduit ces séquences de sites d'épissage. Finalement l'intron 3 a été positionné à 33 nucléotides devant le 3'UTR soit à approximativement la même position que dans le vecteur pAES14. Puisque les positions des introns 1, 2 et 3 du gène *RBCS2* dans notre construction pC3_Xyn1_opt sont similaires à celles du vecteur pAES14, nous nous attendons à ce que cette stratégie améliore de manière similaire les niveaux d'expression de notre transgène. Pour conclure, il a été évalué que seulement 3% des gènes du génome nucléaire de *Chlamydomonas* subissaient de l'épissage alternatif (Labadorf, Link et al. 2010). Considérant cette faible statistique, il est peu probable que notre transgène change de cadre de lecture et donc ne permette pas la traduction de notre protéine d'intérêt ou de XYN1. À noter que cette stratégie d'optimisation a été appliquée exclusivement pour notre vecteur pC3_Xyn1_Opt. Cependant, tel qu'il a été mentionné plus tôt, le vecteur pC3_Xyn1 comporte seulement le premier intron du gène *RBCS2* en position +9.

2.3.5 Peptide 2A FMDV

Chez *Chlamydomonas*, le niveau d'expression d'une cassette d'expression, incluant la séquence codon optimisé du gène codant pour la GFP, est amélioré lorsque celle-ci est fusionnée au gène de sélection *ble* (Fuhrmann, Oertel et al. 1999). Un peu plus d'une décennie plus tard, Rasala et son équipe ont amélioré ce système en incorporant un court peptide auto-protéolytique entre les deux protéines (Rasala, Lee et al. 2012). Ce court peptide d'une longueur de 19 acides aminés est dérivé du *foot and mouth disease virus* (FMDV 2A peptide) (Ryan, King et al. 1991). Lorsqu'il est présent dans le même cadre de lecture (ORF) que les deux protéines adjacentes, celui-ci permet de produire un ARNm bicistronique qui résultera, après la traduction de celui-ci, en deux protéines fonctionnelles distinctes. Il a été démontré que l'auto-clivage du peptide 2A survient spécifiquement en amont de son dernier résidu. En d'autres mots, la protéine positionnée en amont du peptide FMDV 2A reste liée en C-terminal avec celui-ci à l'exception du dernier résidu, qui est dans tous les cas une proline. Celle-ci reste donc fusionnée en N-terminal de la protéine positionnée en aval du peptide 2A (Donnelly, Hughes et al. 2001). Dans leur étude, Rasala

et al. ont démontré que l'utilisation du peptide 2A dans une cassette d'expression offre deux avantages importants. Premièrement, la fusion d'un gène d'intérêt avec un gène de sélection permet d'améliorer drastiquement la sélection des transformants avec de meilleurs niveaux d'expression. De plus, ils ont démontré qu'il était possible de localiser indépendamment le gène d'intérêt grâce à un signal de localisation. Depuis leurs travaux, cette stratégie est fortement utilisée par la communauté scientifique afin de faciliter l'expression de transgène chez *Chlamydomonas* (Doron, Segal et al. 2016). En 2015, Plucinak, Horken et al. (2015) ont testé le peptide 2A du FMDV d'une taille augmentée à 39 acides aminés (Donnelly, Hughes et al. 2001). Selon leurs résultats, ce peptide offre une efficacité de clivage chez *Chlamydomonas* de presque 100%. Dans ce cas, nous avons décidé d'utiliser ce même peptide 2A d'une longueur de 39 a.a. pour nos constructions. Nous nous sommes assurés que la séquence nucléotidique de ce peptide soit placée dans le même cadre de lecture (ORF) que le site multiple de clonage (MCS) et que le gène rapporteur *XYNI*. Pour l'instant, nous assumons que la portion du peptide 2A de 38 a.a. qui restera fusionnée à la future protéine d'intérêt de notre construction n'affectera pas son activité (Rasala, Chao et al. 2014). Tel que mentionné plus tôt, les vecteurs pC3_Xyn1 et pC3_Xyn1_opt ont été conçus pour une utilisation en biologie synthétique. Dans ce sens, bien qu'il aurait été avantageux de fusionner le gène de résistance à l'hygromycine avec le gène rapporteur *XYNI*, nous avons décidé de laisser la place au MCS afin d'intégrer un futur gène d'intérêt qui sera impliqué dans la construction d'une voie métabolique. Il a toutefois été démontré qu'il est possible d'exprimer un poly-cistron à trois gènes séparés par 2 peptides 2A (Rasala, Chao et al. 2014). Ce qui pourrait représenter une alternative future pour conserver le gène de résistance dans le même ORF.

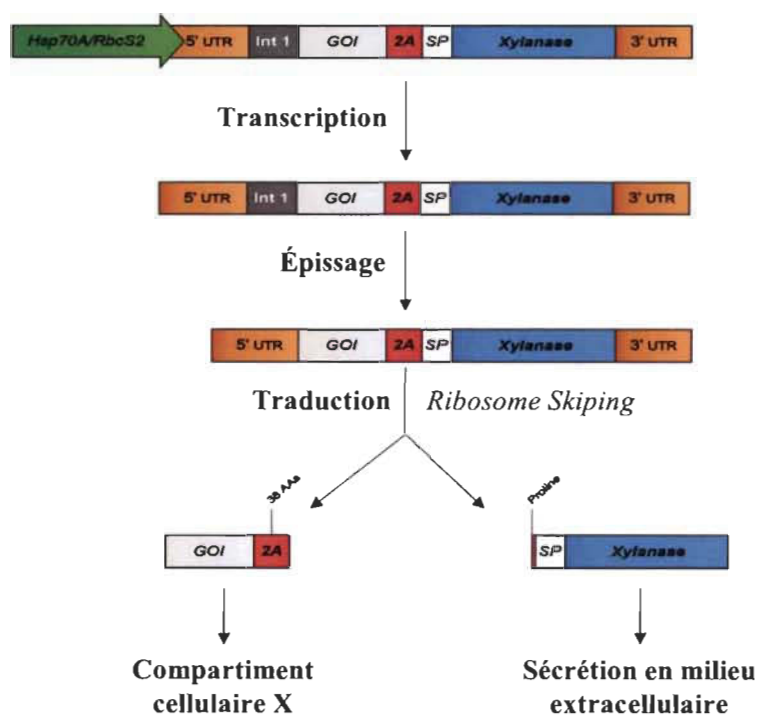


Figure 2.4 Scématisation du mécanisme de clivage du peptide 2A (*Ribosome Skipping*) lors de la traduction de notre transgène.

2.3.6 Peptide Signal ARS1

L'utilisation d'un peptide signal pour la production d'une protéine hétérologue est désirable puisqu'il permet d'envoyer celle-ci directement hors de la cellule ce qui facilite, par la suite, l'isolation de la protéine d'intérêt. Dans notre cas, le signal de sécrétion est un élément indispensable pour le bon fonctionnement de notre système de criblage puisque le substrat de la xylanase se trouve seulement dans le milieu extracellulaire de l'algue. Sachant que l'efficacité de sécrétion est dépendante de la séquence du peptide signal, il est avantageux de choisir un PS de qualité. Jusqu'à présent, un peu plus de 30 différentes protéines recombinantes ont été exprimées à partir des différents génomes de *Chlamydomonas*. Parmi ceux-ci, seulement 6 protéines ont été sécrétées via l'exploitation de signal de sécrétion. Avant 2018, seulement 4 peptides signaux différents avaient été testés (Tableau 2.2) (Ramos-Martinez, Fimognari et al. 2017). Pour la première fois, Molino, de Carvalho et al. (2018) ont comparé l'efficacité de 10 PS, dont les 4 PS déjà connus et 6 nouveaux PS ayant été identifiés via une analyse bio-informatique. Il s'avère que le peptide signal le plus efficace figure parmi les 6 nouvellement identifiés. Entre les

4 PS issus de la littérature, celui offrant une efficacité de sécrétion similaire est ARS1. Bien que ce résultat soit concluant, nous n'avions initialement pas choisi d'utiliser le peptide signal ARS1 pour cette raison. En effet, sachant que la sécrétion de XYN1 grâce à ARS1 avait préalablement été réalisée, nous avons décidé de faire de même pour notre construction sécrétant elle aussi XYN1 (Rasala, Lee et al. 2012).

Tableau 2.2

Liste des peptides signaux endogéniques de *C. reinhardtii* ayant été exploités (avant 2018) pour la sécrétion de protéines hétérologues à partir du génome nucléaire

Séquence du PS	Informations sur la protéine		
	Identification	Taille moléculaire (a.a.)	Source bibliographique
MAQWKAAVLLLALACASY	Binding protein 1 (BiP1)	656	(Rasala, Chao et al. 2014)
MHARKMGALAVLAVACLAAVA SVAHA	Arylsulfatase 1 (ARS1)	654	(Rasala, Lee et al. 2012)
MARTGALLLVALALAGCAQA	Carbonic anhydrase (CAH1)	377	(Lauersen, Berger et al. 2013)
MPSSSMKLF AALLIACMAQT SMA	Ice-binding protein 1 (IBP1)	353	(Raymond James, Janech Michael et al. 2009)

2.3.7 Xylanease (XYN1)

Lors de la conception bio-informatique de nos cassettes d'expression, nous nous sommes assurés de retirer le peptide signal (20 a.a.) déjà présent dans la séquence codante du gène de *XYN1* afin de le remplacer par le PS *ARS1* endogénique à *Chlamydomonas*. Afin de faciliter l'identification et la purification de XYN1, nous avons ajouté 1X FLAG épitope, un Metal affinity tag (MAT) et un His TAG en C-terminal. Ces éléments représentent un total de 38 acides aminés additionnels aux 243 a.a. que composent XYN1 incluant le PS et la proline résiduelle du peptide 2A, ce qui résulte en un polypeptide final de 281 a.a. Suite au clivage du peptide signal dans le réticulum endoplasmique, l'enzyme XYN1 est réduit à 253 a.a., ce qui représente un taille théorique d'environ 27,78 kDa.

L'expression d'une protéine fonctionnelle dans un système hétérologue dépend en grande partie de la composition de la séquence nucléotidique du gène étranger. Un gène provenant d'un organisme différent peut contenir un pourcentage CG différent et contenir des codons plus ou moins compatibles avec l'utilisation des codons de l'organisme hôte. Ceci dit, il est désormais bien connu que ces deux paramètres ont une influence cruciale sur l'expression d'un transgène chez *C. reinhardtii* (Heitzer, Eckert et al. 2007, Barahimipour, Strenkert et al. 2015). Heureusement, des outils bio-informatiques nous permettent désormais d'optimiser une séquence codante d'un gène étranger afin de rendre ces codons mieux compatibles par l'organisme hôte. Dans notre cas, la séquence originale de *XYN1* de *T. reesei* a été codon optimisée par le logiciel Codon Optimization Tool de IDT.

À noter que le gène *XYN1* a volontairement été positionné en aval du peptide 2A afin de s'assurer de sélectionner des colonies d'algues qui expriment notre transgène selon le bon cadre de lecture.

2.4 Construction du vecteur d'expression pC3_Xyn1

Afin de tester notre procédure expérimentale, nous avons initialement débuté la construction du premier vecteur pC3_Xyn1. Malheureusement, bien que nous l'ayons conçu par bio-informatique, nous n'avons finalement pas eu le temps nécessaire pour construire le deuxième vecteur optimisé pC3_Xyn1_Opt. Toutefois, il est à noter que la procédure de construction est à la toute fin très similaire pour les deux cassettes d'expression pC3_Xyn1 et pC3_Xyn1_Opt.

2.4.1 Synthèse, amplification et purification des fragments

Tel que mentionné plus tôt, puisque le vecteur commercial pChlamy_3 contient déjà certains éléments génétiques présents dans notre construction, la séquence Xyn1 ayant été synthétisée comporte, dans l'ordre, les éléments suivants : l'épitope HA, le peptide FMDV 2A, le peptide signal Ars1, la séquence codante codon optimisé de *XYN1* de *T. reesei*, un épitope FLAG, un épitope MAT tag et finalement un épitope His tag. La taille totale du

fragment synthétisé est de 996 nt. Le fragment Xyn1 a été synthétisé par la compagnie GENEWIZ. Tels qu'illustrés à la figure 2.5, des sites de restriction unique ont été positionnés à des endroits stratégiques afin de rendre notre vecteur d'expression versatile.

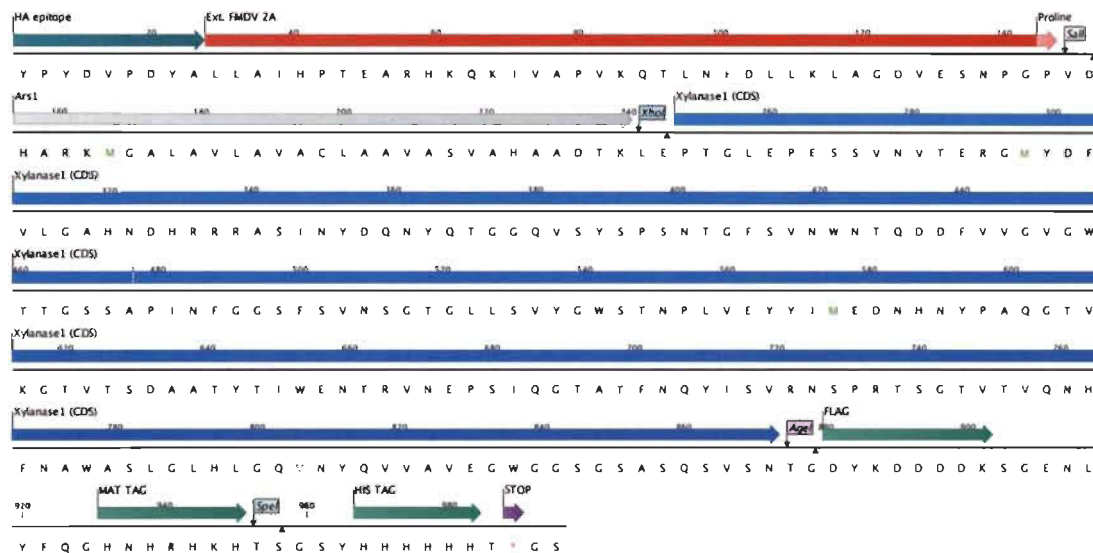


Figure 2.5 Séquence en acide aminés annotée du fragment Xyn1 qui a été synthétisée et puis clonée dans le vecteur commerciale pChlamy_3.

Le vecteur pChlamy_3 a été amplifié et linéarisé en position 773-774 par PCR à l'aide des amorces pC3_lin_773-774_F et pC3_lin_773-774_R. Le fragment Xyn1 a aussi été amplifié par PCR via les amorces Xyn1_pC3comp_F et Xyn1_pC3comp_R. Ces dernières amorces comportent, en leur extrémité 5', un prolongement de 20 nt correspondant aux séquences complémentaires du vecteur pChlamy_3 en position 773-774. Cette addition permettra au fragment *Xyn1* de s'intégrer au bon endroit dans le vecteur pChlamy_3 linéarisé lors de la réaction de clonage par Gibson Assembly. Afin d'assurer l'intégralité de nos fragments, l'ADN polymérase Q5 HF de NEB a été employé pour l'amplification de tous les fragments. Les fragments amplifiés par PCR ont été purifiés sur gel d'agarose 1% grâce au Gel/PCR DNA Fragments kit (Geneaid). Par la suite, les concentrations d'ADN ont été mesurés sur gel d'agarose à l'aide du logiciel Image Lab de bio-rad.

2.4.2 Clonage par la méthode de "Gibson Assembly"

L'intégration de *Xyn1* dans le vecteur pChlamy_3 a été effectuée via la technique de clonage de *Gibson Assembly* (Gibson, Young et al. 2009). Cette méthode de clonage permet d'assembler efficacement de multiples fragments d'ADN en fonction des leurs extrémités chevauchantes complémentaires. Cette technique de clonage est avantageuse puisqu'elle fonctionne bien avec de larges fragments (>1000 pb) et ne dépend pas de la présence de sites de restrictions spécifiques. Le kit de clonage de Gibson Assembly nous a été fourni par la compagnie New England Biolab (NEB). Une réaction de clonage comprend 3 étapes enzymatiques. Premièrement, une exonucléase 5' permet de créer des extrémités 3' simple brin, ce qui facilite l'hybridation des extrémités chevauchantes complémentaires entre des fragments. Deuxièmement, un ADN polymérase permet l'élongation 5' → 3' afin de former l'ADN double brin. Un ADN ligase va finalement permettre la réparation complète des fragments d'ADN nouvellement liés. Ces trois dernières étapes se produisent simultanément dans un même tube selon une température, une durée et un ratio *insert : vecteur* recommandés par le manuel d'instruction du fournisseur.

2.5 Amplification et purification du vecteur d'expression pC3_Xyn1

Une fois la réaction de clonage terminée, le produit d'assemblage a directement été utilisé pour transformer le vecteur pC3_Xyn1 dans des bactéries d'*E. coli* chimio compétentes 5-alpha NEB. Le protocole de transformation a été effectué tel qu'indiqué dans le manuel d'instruction du fournisseur. Les bactéries transformées ont finalement été incubées toute la nuit à 37°C sur une gélose SOC contenant de l'ampicilline. Parmi les quelques 150 colonies isolées ayant poussées sur le milieu de sélection, 15 ont été sélectionnées par PCR afin d'identifier celles ayant correctement intégrées notre plasmide pC3_Xyn1. Pour ce faire, la paire d'amorces pChlamy_3.1 a été utilisée. Parmi les 15 colonies, seulement 4 d'entre elles ont été positivement transformées. La colonie #9 a finalement été choisie afin d'effectuer l'amplification et la purification du plasmide pC3_Xyn1. Cette dernière étape a été complétée à l'aide du Midi Plasmid kit de Geneaid et à partir d'une culture bactérienne de 200 mL. Le protocole de purification sur colonne

du plasmide pC3_Xyn1 a été réalisé selon le manuel d'instruction du fournisseur. L'échantillon du vecteur purifié a ensuite été quantifié par spectrophotométrie et sur gel d'agarose. Finalement, celui-ci a été envoyé à Génome Québec pour séquençage Sanger afin de s'assurer que le vecteur purifié pC3_Xyn1 contienne la bonne séquence nucléotidique de notre cassette d'expression. Les amorces ayant été utilisées pour le séquençage par PCR et le séquençage Sanger sont pChlamy_3.1_F et pChlamy_3.1_R.

2.6 Transfection de *C. reinhardtii* par électroporation

Comme tous les organismes eucaryotiques, la microalgue *Chlamydomonas* possède de l'ADN génomique sous forme linéaire double brin. Dans ce sens, il a été constaté que l'efficacité de transformation était nettement améliorée lorsque le transgène était sous forme linéaire (Meslet-Cladière et Vallon 2011). C'est pourquoi notre vecteur pC3_Xn1 a préalablement été linéarisé par l'enzyme de restriction *SspI*-HF(NEB). Afin d'obtenir un produit de digestion hautement concentré, 10 µg de vecteur circulaire avec 100 U ont été incubés à 37°C durant 4h, suivi d'une désactivation enzymatique à 65°C durant 30 minutes. Sachant que la composition physico-chimique du milieu d'électroporation est un facteur pouvant affecter l'efficacité d'électroporation, un protocole rapide de dessalage des échantillons de vecteurs linéarisés a été effectué. En somme, 25 mL d'eau déionisée ont été versés dans un plat de pétri dont une membrane MF-Milipore (VSWP02500) a été déposée à la surface de l'eau. Finalement, 50 µL du produit de digestion ont ensuite été déposés sur la membrane durant 30 minutes. Le volume de l'échantillon purifié a été récupéré dans un nouveau tube.

La souche utilisée durant ce projet de recherche est la souche uvm4. Celle-ci nous a gracieusement été fournie par le professeur R. Block de l'université Max Plank en Allemagne (Neupert, Karcher et al. 2009). La transfection de la souche uvm4 a été effectuée par électroporation à l'aide du GenePulser XCell™ (BioRad, Hercules, CA). Avant l'électroporation, les microalgues ont été cultivées dans un milieu liquide TAP (Tris-acétatephosphate) sous illumination constante de 5000 lux, à 26 °C et à une agitation d'environ 130 rpm. Lorsque la culture atteint une densité cellulaire de $3-5 \times 10^6$ cell/mL,

les cellules d'algues sont centrifugées à 5000 rpm durant 10 minutes et resuspendues dans le volume nécessaire du milieu d'électroporation MAX Efficiency™ (GeneArt) pour obtenir densité cellulaire de $3-4 \times 10^8$ cell/mL. Un volume de 240 μ L est ensuite récupéré et transféré dans une cuvette à électroporation de 4 mm contenant environ 2 μ g du vecteur, puis incubés sur glace durant 5 minutes. Durant ce temps, l'électroporateur est paramétré à un voltage de 500 V, une capacitance de 50 μ F et une résistance de 800 Ω . Juste avant d'insérer la cuvette dans l'électroporateur, son contenu est doucement mélangé afin d'assurer une bonne homogénéité de la suspension d'algues lors de l'électroporation. Immédiatement après le pulse exponentiel, les cellules sont incubées à température pièce durant 15 minutes sous faible illumination. Le contenu de la cuvette est ensuite transféré dans 10 ml de milieu TAP liquide + 40 mM sucrose frais et incubé durant 18 heures sous faible illumination (1500 lux), à 26°C et à très faible agitation. Les cellules sont finalement récupérées par centrifugation et resuspendues dans 350 μ L de TAP + 40 mM sucrose pour être ensuite ensemencées sur des géloses TAP + 10 μ g/mL d'hygromycine. Les géloses sont incubées sous illumination constante de 5000 lux, à 26°C et à 65% d'humidité jusqu'à l'apparition de colonies isolées.

2.7 Séquençage par PCR des colonies positives

Les colonies d'algues positives ayant stablement intégrées la cassette d'expression Xyn1 ont été déterminées par PCR selon la méthode décrite par Cao, Fu et al. (2009). Brièvement, une portion des colonies isolées est mélangée à un 50 μ L de Chelex 5% et puis vigoureusement vortexée. Les tubes sont ensuite incubés à 98°C durant 10 minutes et puis refroidis sur glace durant 1 minute. Après un second vortex, les tubes sont centrifugés à 14000 rpm durant 1 minute. Un volume de 1 μ L du surnageant est finalement utilisé pour les réactions PCR. La paire d'amorces Col_PCR_Xyn1 a été utilisée pour l'amplification d'un fragment de 274 nt du gène *XYN1*.

2.8 Analyse du niveau d'expression

L'extraction de l'ARN total des colonies positivement identifiées par PCR a été complétée à l'aide du kit d'extraction d'ARN Direct-zol™ Miniprep Plus de la compagnie Zymo research. La procédure d'extraction a été réalisée selon le protocole du fournisseur. Pour ce faire, 600 µL de TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher) ont été mélangés avec approximativement 4×10^7 cellules d'algues. Chaque échantillon a subi un traitement à la DNaseI afin d'éliminer les traces d'ADN génomique. Finalement, l'analyse de la qualité ainsi que la concentration d'ARN des échantillons ont été déterminées par spectrophotométrie et sur gel d'agarose 1%. À noter, qu'environ 500 µg d'ARN de chaque échantillon ont été déposés dans les puits.

La conversion de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) a été effectuée à partir du kit OneStep RT-PCR commercialisé par QIAGEN. Afin de déterminer le niveau d'expression de notre transgène, l'amplification par PCR de XynI a été effectuée en utilisant la paire d'amorces Col_PCR_XynI. À titre de contrôle positif, le gène natif PGK1 codant pour la phosphoglycérate kinase a été amplifié à l'aide des amorces qNuc_PGK_F et qNuc_PGK_R.

2.9 Western blot (immunobuvardage)

L'immunobuvardage de type western a été réalisé à partir des protéines totales issues de la fraction cytosolique et de la fraction extracellulaire (surnageant). Tout d'abord, pour la fraction cytosolique, chaque colonie positive sélectionnée ainsi qu'une colonie mère contrôle non transformée ont été cultivées dans 25 mL de milieu TAP liquide jusqu'à obtenir une densité cellulaire d'environ 1×10^7 cell/mL. Les cellules ont ensuite été concentrées de 50X dans 500 µL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8.0, 400 mM NaCl, 0.5% Tween-20). Les protéines cytosoliques totales ont été libérées des cellules par sonication. Les débris cellulaires ont été écartés du surnageant par centrifugation à 14 000 rpm durant 10 minutes. En second lieu, pour la fraction protéique du surnageant, chaque colonie positive a été cultivée dans 20 mL de milieu TAP liquide jusqu'à obtenir une densité cellulaire de $2-3 \times 10^7$ cell/ml. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 5000 rpm

durant 10 minutes afin de culoter les cellules et de récupérer seulement le surnageant. Les protéines extracellulaires ont été précipitées via la méthode de précipitation à l'acétone. Ce protocole consiste premièrement à ajouter 4 volumes (80 mL) d'acétone froid au surnageant et à l'incuber à -20°C durant 60 minutes. Les mélanges ont par la suite été successivement centrifugés à 14000g durant 10 minutes afin de culoter les protéines précipitées du surnageant. Le surnageant est délicatement décanté et le culot protéique est resuspendu dans le tampon de lyse. Dans notre cas, les protéines du surnageant de chaque culture ont été resuspendues dans 200 µL de tampon de lyse afin de concentrer les échantillons de 100x. La concentration protéique de chaque échantillon a été déterminée par la méthode de Bradford. Les protéiques des deux fractions ont été dilués dans du tampon de dénaturation 4X et puis dénaturés à 95°C pendant 3 minutes. 40 µL de chaque échantillon protéique a été analysé par SDS. Les protéines ont été séparées sur gels SDS 10% à 150 V et puis transférées sur membrane PVDF à l'aide du Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Après avoir bloqué les membranes avec du TBST + 1% BSA, celles-ci ont été incubées à 4°C durant 18h avec l'anticorps 6x-His Epitope Tag antibody (HIS.H*) de Thermo Scientific (Cat. # MA1-21315) selon une dilution de 1 : 3000. Les membranes ont finalement subi 5 lavages de 5 minutes avec du TBST et conjuguées avec l'anticorps secondaire Immun-Star Goat Anti-mouse (GAM)-HRP de Bio-Rad (Cat. # 170-5047) durant 1h. L'anticorps secondaire a été dilué 1 : 20000 dans du TBST+2,5% defatted dry-milk.

Le développement des membranes par chimioluminescence a été visualisé à partir du système d'imagerie ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad). Le substrat Clarity™ Western ECL de Bio-Rad a été employé pour cette expérience.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Tests de faisabilité du système de criblage

Pour commencer, les tests de faisabilité nous ont permis de déterminer si la microalgue *C. reinhardtii* est compatible avec le criblage colorimétrique concerné par ce projet de recherche. Selon nos observations effectuées à tous les jours durant 6 jours, la croissance de *C. reinhardtii* (uvm4) ne semble pas être affectée par la présence de 0,1% de RBB-Xylane dans son milieu de culture solide. L'apparition de jeunes colonies a été constatée au même moment, soit après 3 jours. Après 6 jours de croissance, les colonies présentes sur les deux types de géloses possèdent une taille et une forme similaires. Le nombre de colonies isolées est aussi le même pour les deux conditions (Figure 3.1 B).

À partir de toutes les colonies isolées qui ont été observées, aucune d'entre elles ne présentait un cercle de dégradation (Figure 3.1 A). Ce résultat indique que notre souche ne sécrète naturellement aucune enzyme similaire à XYN1 qui pourrait potentiellement interférer avec notre système de criblage.

Nos essais enzymatiques à partir de la xylanase purifiée sur gélose TAP+0,1% RBB-Xylane ont démontré qu'il était possible de visualiser l'activité de XYN1 via l'apparition d'un cercle de dégradation. Après avoir effectué plusieurs dilutions en série, il a été déterminé que la limite de détection visuelle approximative était de 0,5 mU (Figure 3.1B). En effet, les résultats supportent l'hypothèse que la taille des cercles de dégradation est dépendante à la concentration de l'enzyme. Les cercles de dégradation ont été observés et photographiés selon différents temps d'incubation. Il a été possible d'observer l'apparition des halos autour de chaque papier filtre après 60 minutes d'incubation. C'est à partir de 16 h d'incubation que les cercles de dégradation sont les mieux définis. Concernant le contrôle négatif, il semble que le dépôt de 10 µl sur le papier filtre cause aussi l'apparition

d'un petit halo. Cependant, celui-ci semble être associé davantage à un effet de dilution localisée du RBB-xylane plutôt qu'à une activité enzymatique puisque ce petit halo tend à disparaître en fonction du temps (Figure 3.1 B). Lors de cette expérience, deux conditions d'incubation des géloses ont été utilisées. Dans le premier cas, les géloses ont été ajustées à un pH de 7 et incubées selon les conditions de croissance optimales de *C. reinhardtii*. Dans un deuxième cas, les géloses ont été ajustées à un pH de 5,5 et incubées selon les mêmes conditions que le précédent cas sauf pour la température qui a été augmentée à 37°C. En comparant les cercles de dégradation des deux conditions, il est évident que la xylanase semble être plus active dans une gélose de pH 5,5 et incubée à 37°C.

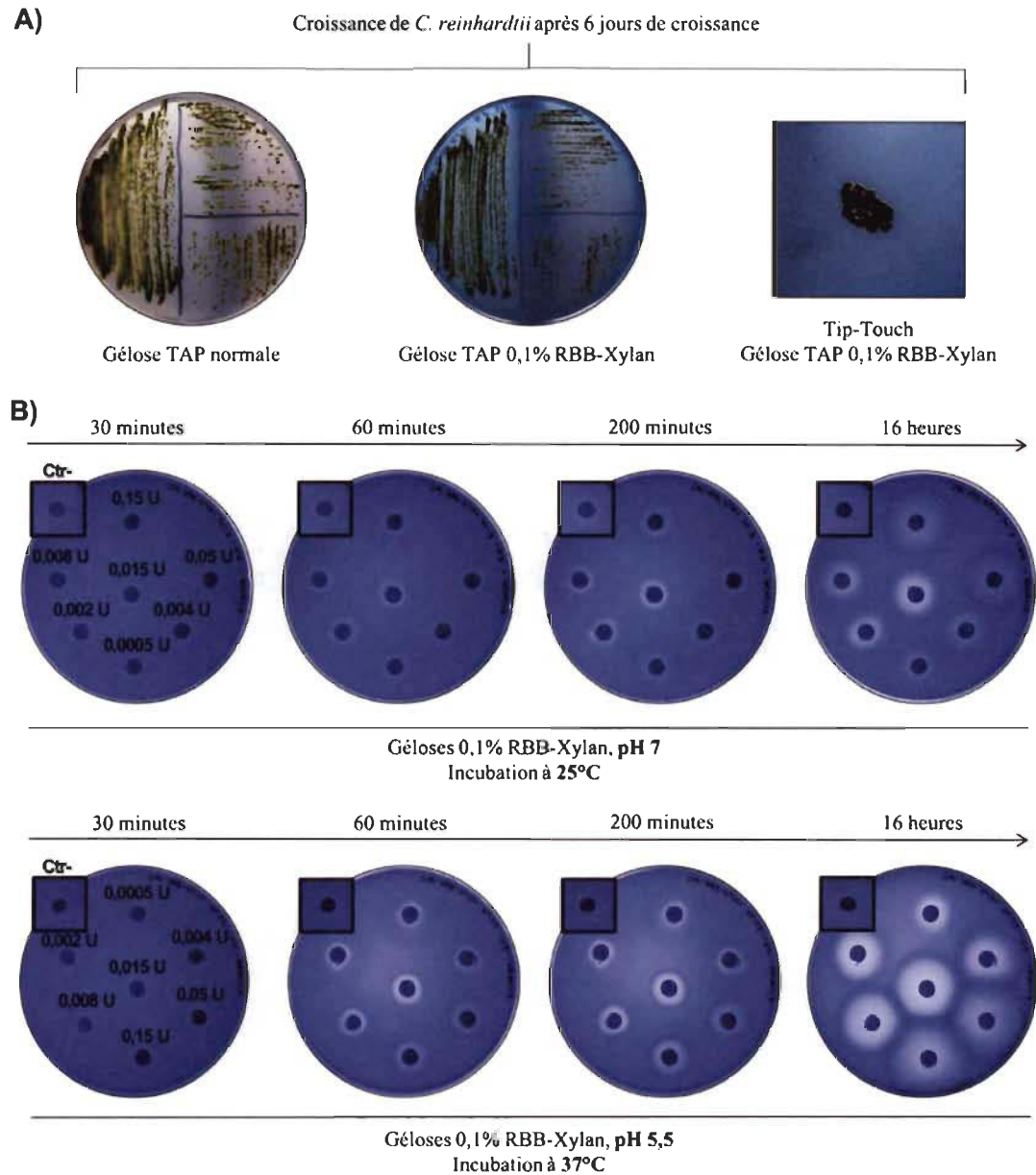


Figure 3.1 Tests de faisabilité du système de criblage sur péturie RBB-Xylane. A) Observation de la survie de la micro-algue *C. reinhardtii* en présence de RBB-Xylane ainsi que de l'apparition de cercles de dégradation après 6 jours de croissance sur une gélose TAP+0,1% RBB-Xylane. B) Observation de la formation des cercles de dégradation en fonction du temps (16h) et de la concentration de xylanase purifiée selon deux conditions d'incubation différentes. Les différentes dilutions (10 μ L) de xylanase purifiées provenant de *Trichoderma viride* (megazyme) ont été déposées sur des papiers Watman de 0,6 cm de diamètre. 10 μ L de 3,2 M d'ammonium sulfate ont été utilisés comme contrôle négatif.

3.2 Construction du vecteur d'expression pC3_Xyn1

Le vecteur attendu suite au clonage du fragment Xyn1 dans le vecteur commercial pChlamy_3 est celui représenté à la figure 3.2. Celui-ci a été nommé pChlamy_3_Xyn1 (pC3_Xyn1) et fait une taille totale de 5513 pb. Le vecteur pC3_Xyn1 correspond au vecteur qui sera ultimement transfecté dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*.

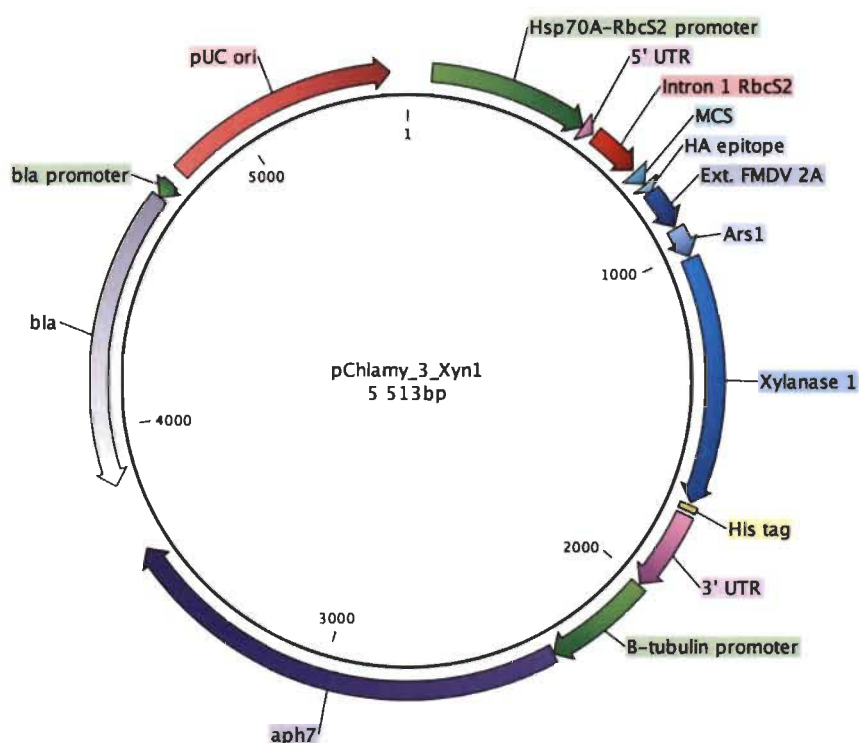


Figure 3.2 Carte annotée du vecteur pChlamy_3_Xyn1 (pC3_Xyn1). pUC ori : origine de réplication bactérien; bla promoteur : promoteur du gène de résistance à l'antibiotique de l'ampiciline (bla); bla : gène de résistance à l'ampiciline; HSP70A-RBCS2 promoteur : promoteur chimérique endogénique à *C. reinhardtii*; 5'UTR et 3'UTR : région non traduite du gène RbcS2; Intron1 RBCS2 : Intron 1 du gène RBCS2 de *C. reinhardtii*; MCS : site multiple de clonage; HA epitope : épitope Human influenza hemagglutinin (HA); Ext. FMDV 2A : Peptide 2A du Foot and Mouth Disease Virus (FMDV); Ars1: peptide signal du gène de l'arasyl-sulfatase de *C. reinhardtii*; Xylanase 1 : gène XYN1 de *T. reesei* codon optimisé; His tag : épitope 6xHis; β -tubulin promoteur : promoteur du gène de la β -tubuline et aph7 : gène résistance à l'hygromycine.

3.2.1 Clonage par la méthode de "Gibson Assembly"

Préalablement au clonage du fragment Xyn1 en position 773-774 du vecteur pChlamy_3, les deux fragments ont dû être amplifiés et purifiés.

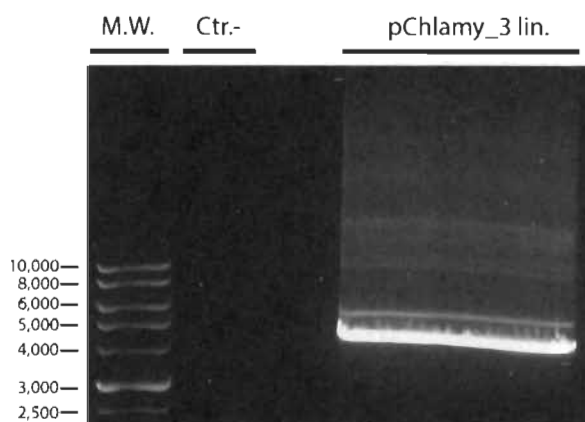


Figure 3.3 Amplification et linéarisation du vecteur commercial pChlamy_3. 150 μ L provenant de 5 produits d'amplification identiques de pChlamy_3 ont été déposés dans un même puits afin de faciliter la purification sur gel. Ctr.- : PCR sans vecteur.

Initialement, l'amplification du vecteur pChlamy_3 à partir d'une seule amplification par PCR ne nous permettait pas d'obtenir une bande suffisamment intense pour procéder à l'extraction sur gel. Nous avons donc rassemblé dans un même puits un volume total de 150 μ L issus de 5 produits d'amplification identiques de pChlamy_3 (Figure 3.3). Cette méthode nous a permis d'accroître le rendement de l'extraction sur gel de la bande désirée. Au contraire, l'amplification du fragment Xyn1 a démontré une bande intense et unique, ce qui nous a permis d'éviter de faire une purification sur gel et d'utiliser directement le produit PCR pour la réaction de Gibson Assembly (Figure 3.4). Avant de procéder au clonage, les concentrations des fragments Xyn1 et pChlamy_3 ont été mesurées sur gel d'agarose 1%. Les résultats du logiciel Image Lab de Bio Rad indiquent que les échantillons des deux fragments sont en concentration similaire, soit d'environ 20 ng/ μ L. Ces concentrations ont donc été prises en considération pour le calcul des quantités recommandées pour la réaction de clonage par Gibson Assembly. De plus, les résultats du gel d'électrophorèse pour la quantification des fragments indiquent un bon niveau de pureté pour les deux échantillons (Figure 3.4).

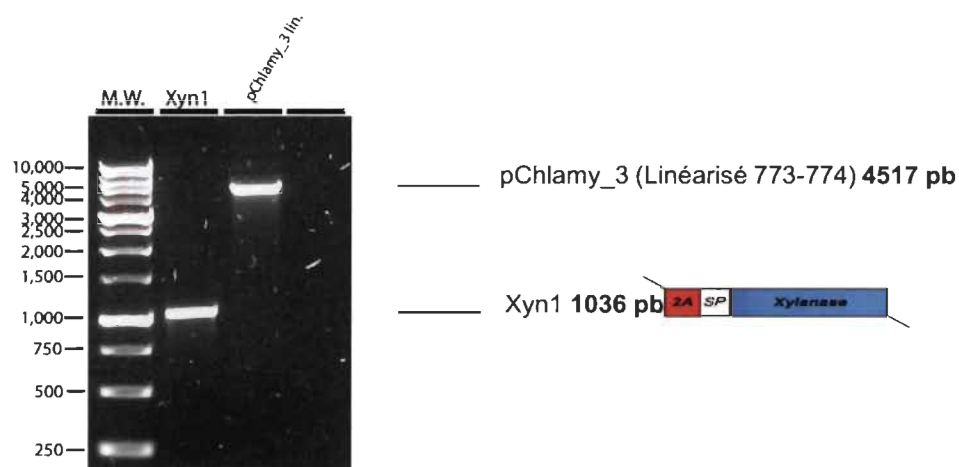


Figure 3.4 Quantification d'ADN et vérification de la pureté des échantillons des fragments pChlamy_3 linéarisé et Xyn1.

À noter qu'il est normal d'observer une taille du fragment de Xyn1 supérieure à 996 nt puisque 20 nt ont été ajoutés aux extrémités 5' et 3' des amorces lors de l'amplification par PCR. Ce qui résulte en un fragment d'une taille de 1036 nt.

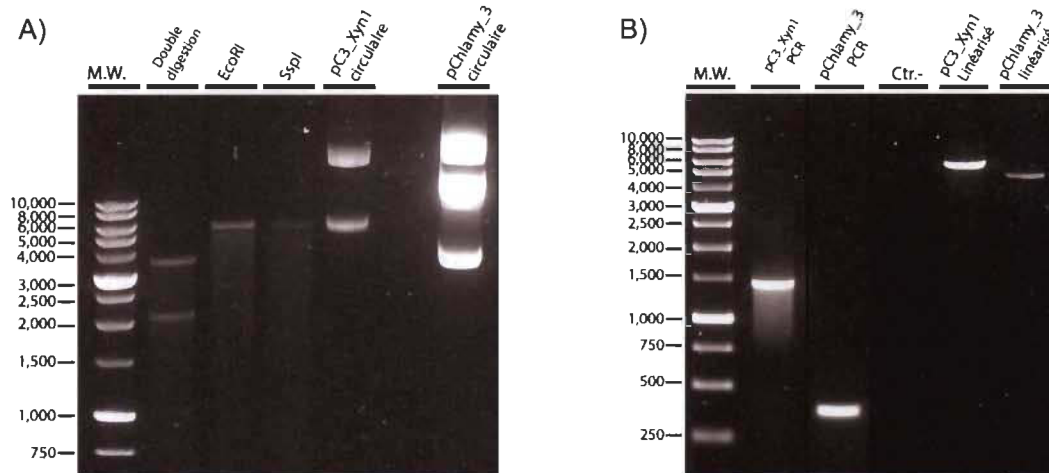


Figure 3.5 Vérification du clonage du fragment Xyn1 dans le vecteur pChlamy_3. A) Digestion simple et double du vecteur pC3_Xyn1 et migration des vecteurs pC3_Xyn1 et pChlamy_3 sous forme circulaire. La double digestion a été effectuée avec les enzymes *EcoRI* et *HindIII* B) Comparaison des produits d'amplification PCR à partir des vecteurs pC3_Xyn1 et pChlamy_3. Comparaison de la taille des vecteurs pC3_Xyn1 et pChlamy_3 sous forme linéaire. Ctr.- : PCR sans vecteur.

Afin de déterminer si le clonage du fragment Xyn1 dans le vecteur pChlamy_3 a bien fonctionné, une double digestion a été effectuée à partir de sites de restriction unique, soient les enzymes *Hind*III et *Eco*RI coupant le vecteur pC3_Xyn1 aux positions 339-340 et 2398-2399 respectivement. Tout d'abord, nous avons employé ces deux enzymes puisque leur site de restriction se trouvent à un seul endroit dans le vecteur pC3_Xyn1. En second lieu, *Hind*III a été utilisé, car son site de clivage se situe à même la cassette d'expression soit dans le promoteur chimérique *HSP70A/RBCS2*. Les résultats de la double digestion correspondent aux tailles de fragments attendus soient de 3451 nt et 2064 nt (Figure 3.5). Cette expérience démontre que la cassette d'expression Xyn1 a bel et bien été intégrée dans la région désirée du vecteur soit dans le fragment de 2064 nt. Des digestions simples à partir des enzymes *Eco*RI et *Ssp*I ont aussi été effectuées en parallèle selon les mêmes conditions afin de comparer l'efficacité de digestion de *Ssp*I avec *Eco*RI. *Ssp*I sera utilisé lors de la linéarisation du vecteur avant la transfection de *Chlamydomonas*. Cette enzyme a été choisie puisque son seul site de clivage est éloigné de la cassette d'expression, soit en position 4709-4710. La digestion simple à partir de *Ssp*I semble moins efficace qu'avec *Eco*RI puisque l'intensité de sa bande est moins intense. Cependant, on constate qu'une seule bande possède la taille désirée pour les deux digestions simples. Ce résultat indique que la majorité des vecteurs pC3_Xyn1 sous forme circulaire a été convertie sous forme linéaire (Figure 3.5).

L'amplification par PCR de l'échantillon de pC3_Xyn1 circulaire avec la paire d'amorces pChlamy_3.1 démontre une bande à la taille attendue de 1387 nt. En comparant la taille de la bande issue de l'amplification du vecteur pChlamy_3 avec celle de pC3_Xyn1, on observe une différence d'environ 1000 nt, ce qui correspond à la différence théorique de 996 nt. Le même constat est aussi observable lorsque l'on compare les tailles de pC3_Xyn1 linéarisé et de pChlamy_3 linéarisé. Ceux-ci présentent respectivement une bande à environ 5500 et 4500 nt. Finalement, les résultats de séquençage de pC3_Xyn1 obtenus par Génome Québec indiquent que la cassette d'expression de pC3_Xyn1 est identique à celle initialement conçue *in silico* et que le fragment Xyn1 se trouve dans la bonne orientation dans le vecteur (Figure 3.6).

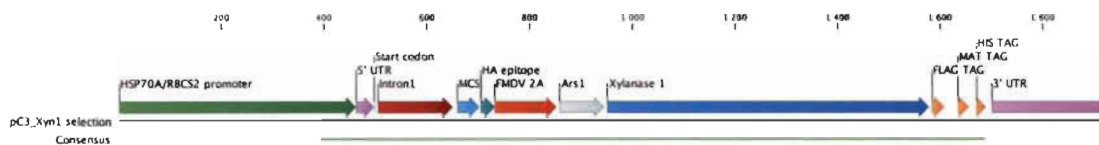


Figure 3.6 Aligment de la séquence d'ADN séquencée par Génome Québec avec la séquence *in silico* de la cassette d'expression pC3_Xyn1.

3.2.2 Amplification du vecteur d'expression pC3_Xyn1

Pour chaque transfection par électroporation de *Chlamydomonas*, 2 μg du vecteur linéarisé sont nécessaires. Dans ce sens, l'un des défis est d'obtenir un échantillon du vecteur d'expression linéarisé en grande concentration. Considérant que le protocole de digestion engendre une dilution, que le rendement de digestion n'est généralement pas de 100% et que le protocole d'élimination des sels entraîne des pertes, il est essentiel de posséder un échantillon initial de plasmides hautement concentré afin d'obtenir un échantillon final suffisamment concentré pour obtenir 2 μg de vecteur dans moins de 10 μl . Cela dans le but de minimiser la modification de la composition de la solution d'électroporation. Suite à la purification du plasmide pC3_Xyn1 issue d'une culture bactérienne, notre échantillon plasmidique initiale indique une concentration d'ADN d'environ 300 ng/ μl . Suite à la digestion optimisée par *SspI* et à l'élimination des sels, les mesures de quantification d'ADN indiquent une concentration finale d'environ 300 ng/ μl . Ce résultat est satisfaisant puisqu'il faudra seulement 7 μl de cet échantillon pour obtenir 2 μg du vecteur linéarisé. De plus, la migration sur gel d'agarose de cet échantillon présente une seule bande à la taille attendue (5500 nt), ce qui indique que la grande majorité des 300 ng/ μL d'ADN correspond bel et bien au vecteur pC3_Xyn1 sous forme linéaire (Figure 3.7).

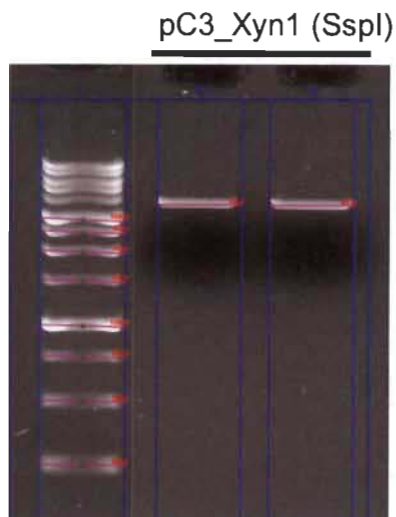


Figure 3.7 Quantification d'ADN sur gel et vérification de la pureté de l'échantillon finale du vecteur pC3_Xyn1 linéarisé par *SspI*. Deux aliquots de 5 µL de l'échantillon de pC3_Xyn1 linéarisé ont été déposés dans le gel d'agarose 1%. La quantité d'ADN de l'échantillon a été calculée via le logiciel ImageLab à partir de l'échelle de poids moléculaire.

3.3 Électroporation de *Chlamydomonas reinhardtii*

Le protocole d'électroporation #1 a été développé et optimisé au laboratoire au cours de ce projet de recherche. Celui-ci a été inspiré de différents protocoles cités dans la littérature, mais a été adapté afin de répondre aux conditions propres de notre laboratoire ainsi qu'à la souche de *Chlamydomonas reinhardtii* uvm4. Le protocole #2 correspond au protocole publié récemment par Molino, de Carvalho et al. (2018). Nous avons comparé le rendement des deux protocoles afin de valider l'efficacité du protocole #1. Le protocole #2 a été effectué selon la description des étapes présentées sur le site internet et des commentaires de l'auteur. Tout d'abord, notre protocole #1 a démontré un excellent rendement de transformation. Le temps du pulse électrique (TC) mesuré a été de 29 ms. On peut observer un grand nombre de colonies isolées sur les géloses 0,1% RBB-Xylane supplémentées en hygromycine (Figure 3.8). Le nombre de colonies semble augmenter proportionnellement au volume ayant été ajouté sur les 3 géloses. Le contrôle négatif sans sélection à l'hygromycine présente une très forte densité d'algues ce qui indique qu'il y a bel et bien une sélection des transformants positifs possédant le gène de résistance à

l'hygromycine. Finalement, une autre électroporation contrôle sans vecteur pC3_Xyn1 a été effectuée. Comme prévu, aucune colonie isolée n'a poussé sur ces géloses ce qui indique que les chances de sélectionner un transformant faux-positif sont faibles. Au contraire, les résultats issus de la transformation #2 ont été moins concluants puisqu'aucune colonie isolée n'a été observée sur les géloses 0,1% RBB-Xylane + hygromycine. Le TC qui a été mesuré pour ce dernier protocole a été de 4 ms. Le contrôle négatif sans hygromycine démontre pourtant le même résultat que pour le protocole #1 indiquant que l'absence de colonie isolée n'est pas dû à un trop grand stress engendré par le pulse électrique, mais plutôt à cause de l'absence de colonies positives exprimant le gène de résistance à l'hygromycine.

Contrairement à ce qui était attendu, aucune colonie positive obtenue, à partir de l'électroporation #1, présentait un cercle de dégradation. Toutefois, afin de valider la stabilité des transformants positifs qui ont été obtenus lors de la transfection #1, 90 colonies isolées ont été transférées sur deux nouvelles géloses RBB-Xylane contenant de l'hygromycine. Une colonie d'algues mères non-transformées a été déposée sur chacune des géloses à titre de contrôle négatif. Toutes les colonies positives ont repoussé avec succès tandis que les colonies contrôles n'ont pas survécu (Figure 3.9). Dans le même ordre d'idées, parmi les 90 colonies, 30 d'entre elles ont été sélectionnées et analysées par PCR à l'aide d'amorces amplifiant spécifiquement 274 nt du transgène *XYN1*. Toutes les colonies ont présenté une bande à la taille désirée, mais pas toutes selon la même intensité ni le même niveau de pureté (Figure 3.9). 12 d'entre elles présentent d'autres bandes non spécifiques supplémentaires. Les 18 autres présentent une seule bande intense à la taille désirée de 274 nt. Parmi ces 18 colonies positives, 6 ont été sélectionnées afin de poursuivre les analyses, soient les colonies 1, 3, 6, 8, 12 et 24.

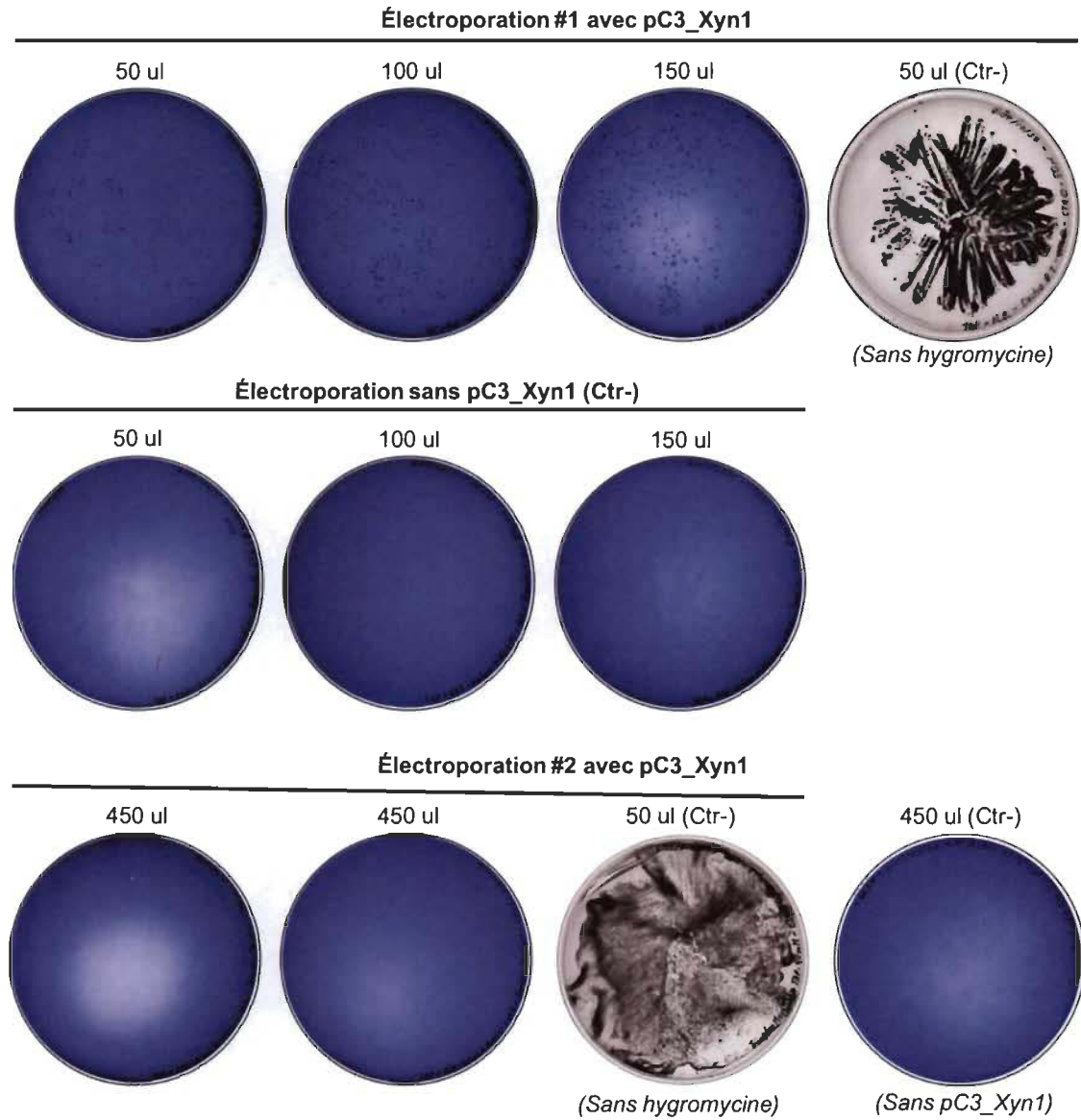


Figure 3.8 Rendement des protocoles d'électroporation #1 et #2 pour la transfection du vecteur pC3_Xyn1 dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les géloses bleues contiennent 0,1% de RBB-Xylane.

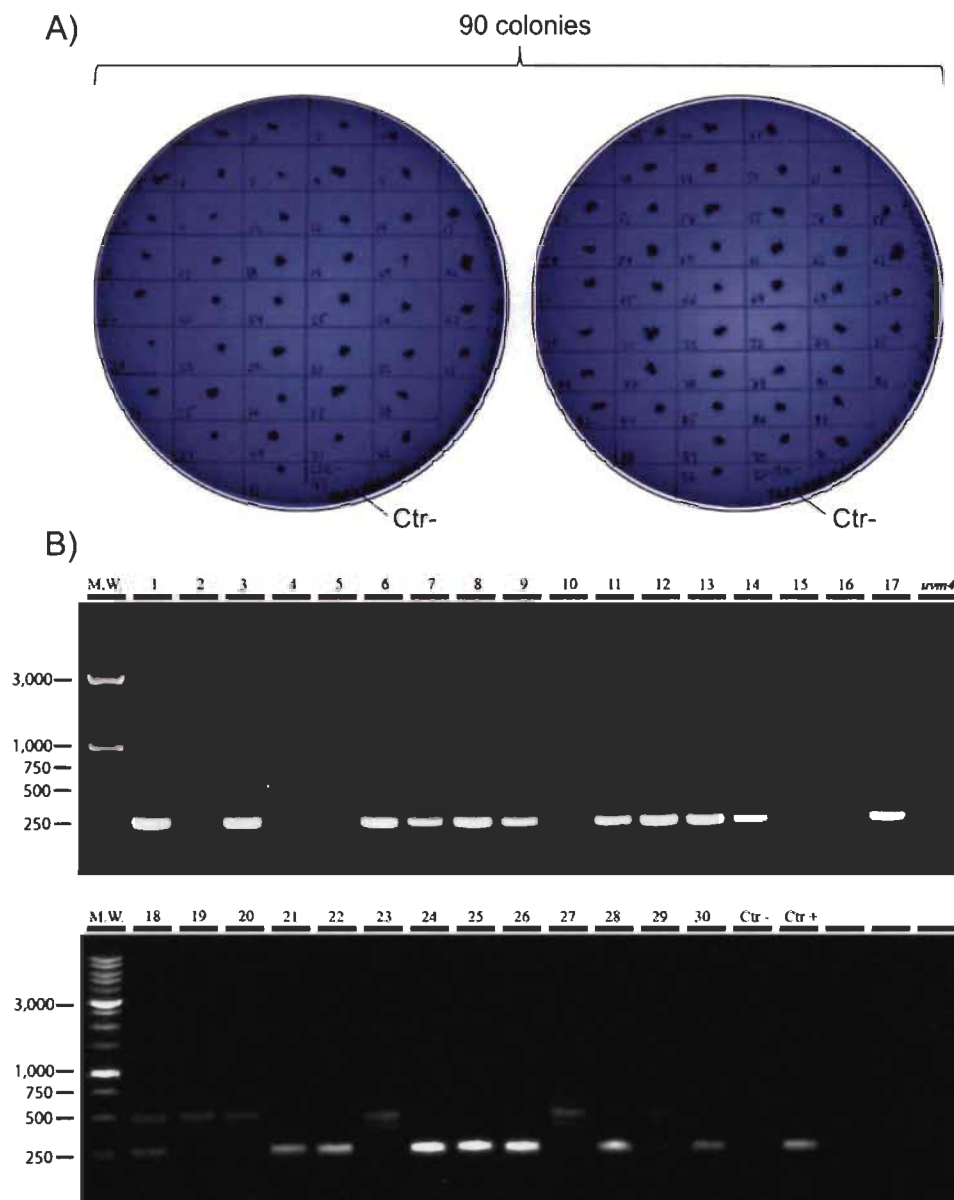


Figure 3.9 Criblage des colonies positives par PCR.
 A) Repiquage de 90 colonies positives issues de la transformation #1 sur géloses TAP- 0,1% RBB-Xylane contenant 15 μ g/mL d'hygromycine. Ctr.- : colonie mère (*uvm4*) non transformée. B) Séquençage par PCR du transgène *Xyn1* à partir de 30 colonies positives sélectionnées parmi les 90 colonies positives. Ctr- : colonie mère (*uvm4*) non transformée.

3.4 Séquençage des colonies positives par PCR

Afin de vérifier l'intégralité de la séquence du transgène pC3_*Xyn1* qui a intégré le génome de nos colonies positives, des produits PCR amplifiant l'entièreté de la cassette

d'expression ont été envoyés à Génome Québec afin d'y être séquencés. Seule les colonies 1 et 3 ont été analysées. Pour les transformants, les résultats obtenus par Génome Québec indiquent que le transgène pC3_Xyn1 n'a subi aucune modification et correspondent donc à la séquence de pC3_Xyn1 qui a préalablement été conçue par bio-informatique.

3.5 Analyse du niveau d'expression

Bien que la xylanase ne semble pas être sécrétée par nos transformants positifs obtenus à partir de la transformation #1, nous avons tout d'abord vérifié si ceux-ci expriment correctement la cassette d'expression pC3_Xyn1. Pour ce faire, nous avons tenté d'amplifier par PCR l'ADN complémentaire issu de l'ARNm de pC3_Xyn1 à partir des 6 colonies positives sélectionnées plus tôt.

3.5.1 Extraction d'ARN

L'extraction de l'ARN a été effectuée à partir des colonies positives 1, 3, 6, 8, 12 et 24 ainsi qu'à partir d'une colonie mère non transformée. La qualité des échantillons d'ARN a été évaluée sur gel d'agarose 1% (Figure 3.10). Les bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S sont observables pour chacun des échantillons. Cependant, leur intensité est majoritairement très faible sauf pour la colonie contrôle uvm4. De plus, la présence de trainées "smears" ainsi qu'un signal plus intense dans le bas du gel pour chacun des échantillons d'ARN reflètent la présence d'ARN dégradé. Bien que la qualité de nos échantillons d'ARN ne semble pas optimale, ceux-ci ont tout de même été retenus afin de poursuivre vers la conversion en ADN complémentaire.

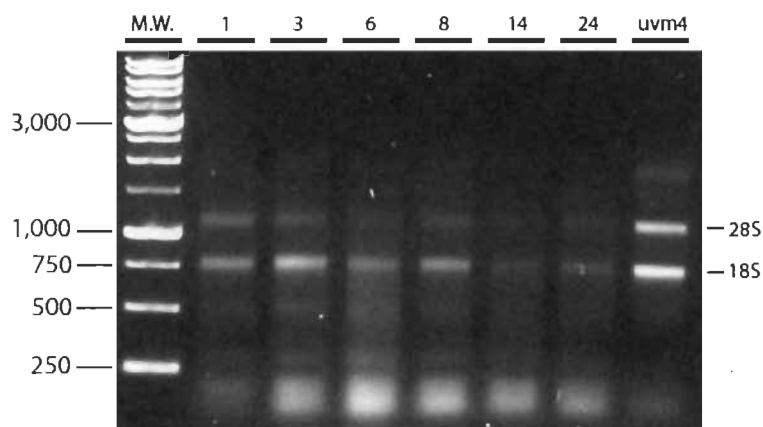


Figure 3.10 Évaluation de la qualité des échantillons d'ARN issus des colonies positives sélectionnées. uvm4 : colonie mère non transformée (Ctr.-).

3.5.2 Amplification par PCR de l'ADNc

À titre de contrôle, nous avons tout d'abord tenté d'amplifier un gène de référence endogénique constitutivement exprimé à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le gène de référence choisi est présent en une seule copie dans le génome nucléaire de la microalgue et code pour la phosphoglycerate kinase (GenBank: U14912.1), une enzyme impliquée dans la glycolyse (Kitayama et Togasaki 1995). L'amplicon attendu fait une taille de 100 nt. L'amplification à partir des échantillons d'ADNc de chacune des colonies positives présente une bande de faible intensité à la taille attendue. Toutefois, le même résultat a été obtenu à partir des échantillons d'ARN où normalement, aucune amplification ne devrait être possible (Figure 3.11). Ce dernier résultat indique que malgré le traitement à la DNaseI des échantillons d'ARN, de l'ADN génomique résiduel serait toujours présent dans nos échantillons d'ADNc. Par conséquent, les signaux d'amplifications obtenues à partir des échantillons d'ADNc ne nous permettent pas de déterminer si le gène réellement est exprimé ou non.

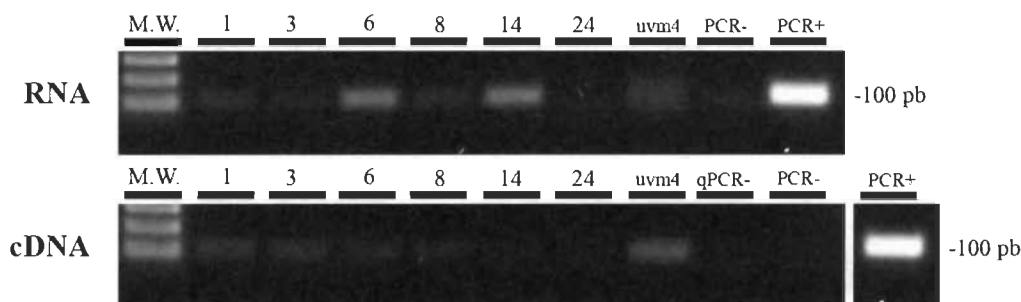
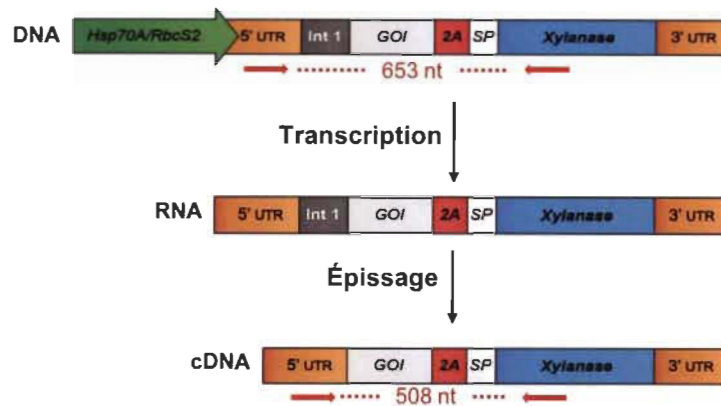


Figure 3.11 Amplification par PCR du gène de la phosphoglycérate kinase endogénique au génome nucléaire de *C. reinhardtii* à partir des échantillons d'ARN et d'ADNc des colonies positives. Une colonie mère uvm4 non transformée a été utilisée comme contrôle. qPCR- : réaction de la transcriptase inverse sans ARN. PCR- : réaction PCR avec eau. PCR+ : amplification à partir de l'échantillon d'extraction ADN génomique d'une colonie mère uvm4 non transformée.

Étant donné que nos échantillons d'ADNc contiennent des traces résiduels d'ADN génomique, nous avons conçu des amorces qui amplifient une section de notre cassette d'expression dans lequel se trouve l'intron 1. Tel qu'illustré à la figure 3.12, l'épissage de l'ARNm de notre transgène, lors de sa maturation, réduit la taille de l'amplicon attendu à partir de la même paire d'amorces. Dans ce sens, des tailles d'amplicon de 508 nt et de 653 nt sont attendus à partir de l'ADNc et de l'ADN génomique, respectivement. Pour tous les transformants, une seule bande de 650 nt a été obtenues (Figure 3.12). L'absence de la bande à 508 nt indique que notre transgène n'est probablement pas exprimé. Toutefois, puisque les résultats d'amplification du gène contrôle ne sont pas concluants, il est aussi possible que la qualité initiale de nos échantillons d'ARN n'ait pas été de qualité suffisante pour être en mesure d'obtenir de l'ADNc. En conclusion, les résultats d'expression de pC3_XynI ne nous permettent pas de savoir si notre transgène est exprimé ou non.

A)



B)

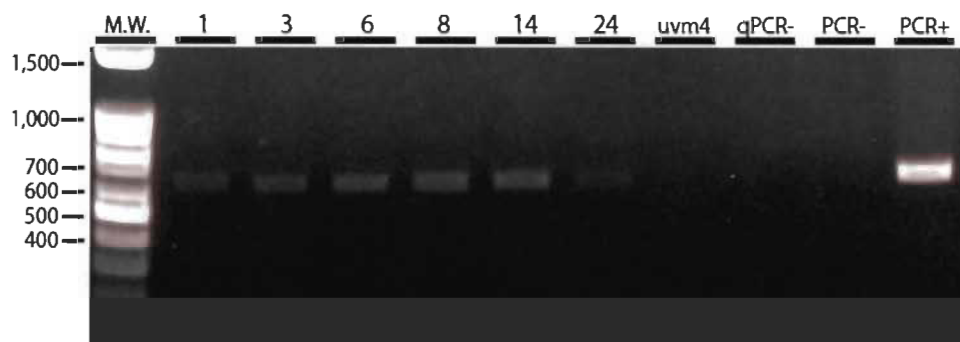


Figure 3.12 Amplification du transgène pC3_Xyn1 à partir des échantillons d'ADNc issus des transformants positifs sélectionnés. Une colonie mère uvm4 non transformée a été utilisée comme contrôle. qPCR- : réaction de la transcriptase inverse sans ARN. PCR- : réaction PCR avec eau. PCR+ : amplification à partir de l'échantillon d'extraction ADN génomique d'une colonie mère uvm4 non transformée.

3.6 Analyse protéique

L'analyse de la présence de la xylanase correspond à la dernière étape de la démarche expérimentale de ce projet de recherche. Ultimement, cette étape nous a permis de déterminer si les transformants positifs ayant intégré notre cassette d'expression dans leur génome nucléaire étaient en mesure de synthétiser et de sécréter correctement la xylanase. Afin de maximiser la récolte des protéines solubles totales issues du cytosol et du surnageant, les protéines des deux fractions ont été concentrées. Les protéines de la

fraction cytosolique ont été concentrées de 50X tandis que celles de la fraction extracellulaire ont été concentrées de 100X.

3.6.1 Concentration protéique

Tout d'abord, pour la fraction cytosolique, il a été possible d'obtenir des échantillons fortement concentrés en protéines totales solubles. Les mesures de quantification protéique par la méthode de Bradford indiquent que tous nos échantillons contiennent plus de 3,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Il est intéressant de noter que les concentrations de protéines cytosoliques des échantillons sont toutes similaires. Ceci indique que le protocole d'extraction est robuste et reproductible puisque que les densités cellulaires des cultures étaient toutes aussi similaires. Étant moins abondantes et surtout très diluées, les protéines extracellulaires ont été concentrées à l'acétone tel que décrit plus tôt. Cette procédure nous a permis de récolter des quantités de protéines acceptables variant de 0,67 à 2,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Préalablement à la concentration à l'acétone, une quantification des protéines extracellulaires, directement à partir du surnageant, a été effectuée. L'absence de coloration indique que leur concentration était sous la limite de détection de la méthode de Bradford, soit environ moins de 0,07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En considérant les concentrations post-concentration à l'acétone, ce dernier résultat est pertinent sachant que nous avons concentré nos protéines de 100 fois. En d'autres mots, même avec la concentration la plus élevée, soit de 2,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la concentration initiale de l'échantillon serait de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, soit une valeur plus faible que la limite de détection de la méthode Bradford. En comparant les valeurs de concentration protéique avant et après la procédure de concentration à l'acétone, on peut conclure que le protocole a bel et bien fonctionné, mais offre des rendements variables. À titre de contrôle positif, un milieu de culture TAP contenant 2,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA a été préparé. La concentration de BSA qui a été mesurée après la méthode de concentration à l'acétone, a été de 2,24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ce résultat nous confirme que cette méthode est compatible avec notre milieu de culture et offre un bon rendement.

Tableau 3.1

Quantification protéique des échantillons de protéines des fractions cellulaires et du surnageant via la méthode de Bradford

Échantillon	Échantillon concentrée (cell/ml)	[Protéines] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Avant)	[Protéines] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Après)
Fraction cellulaire			
Col. 1	3,5 - 4×10^8	n/a	3,58
Col. 3	3,5 - 4×10^8	n/a	3,47
Col. 6	3,5 - 4×10^8	n/a	3,78
Col. 8	3,5 - 4×10^8	n/a	3,38
Col. 12	3,5 - 4×10^8	n/a	3,28
Col. 24	3,5 - 4×10^8	n/a	3,17
Ctr - (<i>uvm4</i>)	3,5 - 4×10^8	n/a	3,49
Fraction surnageant			
Col. 1	2,5 - 3×10^7	0	0,72
Col. 3	2,5 - 3×10^7	0	1,82
Col. 6	2,5 - 3×10^7	0	1,07
Col. 8	2,5 - 3×10^7	0	2,15
Col. 12	2,5 - 3×10^7	0	1,61
Col. 24	2,5 - 3×10^7	0	0,86
Col. Ctr - (<i>uvm4</i>)	2,5 - 3×10^7	0	1,12
Ctr- (TAP)	0	0	0
Ctr+ (2,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA)	n/a	2,39	2,24

3.6.2 Fraction cellulaire

Les protéines cellulaires de chaque échantillon concentré ont été déposées sur 2 gels SDS page. Après leur migration, un gel a été coloré au bleu de Coomassie et l'autre a été utilisé pour effectuer un transfert des protéines sur une membrane PVDF.

Des volumes de 20 μl (\approx 65 μg de protéines) de chaque échantillon protéique concentré ont été déposés dans chaque puits. Tout d'abord, la coloration au bleu de Coomassie du premier gel SDS page nous a permis de visualiser le patron globale des protéines présentes dans nos transformants positifs. Dans notre cas, la taille attendue de

XYN1 est d'environ 27 kDa (Figure 3.13). Bien que XYN1 possède un PS et que celle-ci devrait se trouver en plus grande quantité dans le surnageant, il est normal de la retrouver en faible quantité dans la fraction cellulaire. Tel qu'il a été clairement démontré par microscopie à fluorescence, les protéines possédant un PS sont aussi contenues dans des vésicules de transport (Molino, de Carvalho et al. 2018). Dans ce sens, lors de la sonication et de la lyse des membranes, ces protéines peuvent être, elles aussi, récupérées et mélangées au reste des protéines cellulaires solubles totales. En comparant les patrons de migration des protéines issues des colonies positives avec celui de la colonie parentale non transformée, on observe aucune différence de taille et d'intensité pour les bandes se rapprochant de 27 kDa. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la quantité de XYN1 intra-vésiculaire résiduelle dans les échantillons est trop faible pour offrir une augmentation de la bande à la taille attendue de 27 kDa. Ce résultat concorde avec ceux de Molino et son équipe puisqu'eux aussi n'ont pas observé d'augmentation de l'intensité de la bande de leurs protéines d'intérêt (mCherry) possédant un PS, à partir d'une coloration au bleu de Coomassie pour la fraction cellulaire. Il est pourtant intéressant de noter qu'ils ont, par la suite, été en mesure de détecter un faible signal de leur mCherry par immunobuvardage de type Western. En conclusion, le gel de Coomassie des protéines solubles totales nous renseigne sur la complexité et l'abondance relative des protéines présentes chez *Chlamydomonas*, mais ne nous indique pas si notre protéine rapporteuse xyn1 est présente ou non.

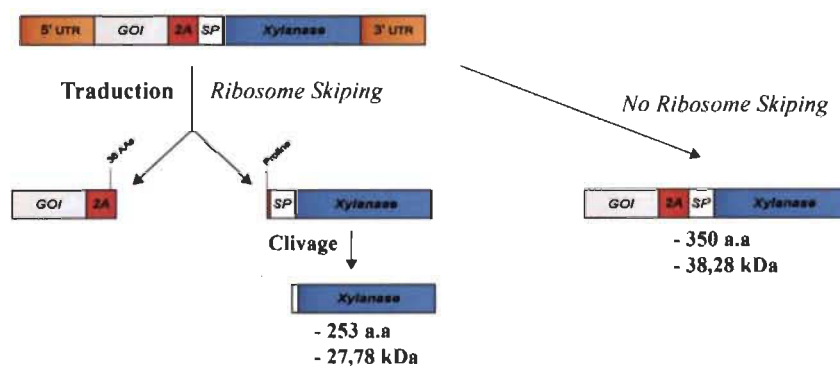


Figure 3.13 Schémas illustrant les tailles (kDa) théoriques de XYN1 synthétisée à partir du transgène pC3_Xyn1 en fonction du clivage ou non clivage du peptide 2A lors de la traduction.

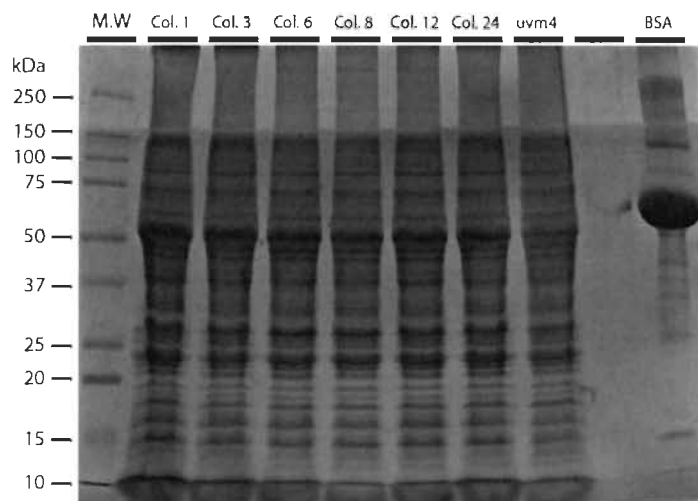


Figure 3.14 Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des protéines totales de la fraction cytosolique des transformants positifs sélectionnés. 65 μ g de protéines ont été déposés dans chaque puits pour chaque transformant ainsi que pour la colonie mère uvm4. 25 μ g de BSA ont été déposés. uvm4 : colonie mère non transformée. BSA (Bovine Serum Albumine): contrôle positif (66,5 kDa).

Les protéines cellulaires ayant été transférées sur membrane PVDF ont été révélées par immunobuvardage de type western. Aucun signal n'a pu être détecté aux tailles attendues de 27 kDa et 38 kDa (Figure 3.15). L'absence de bande à 38 kDa est plus ou moins cohérente avec la littérature puisqu'il a été démontré que le taux d'efficacité du "ribosome skipping" du peptide FMDV 2A, lors de la traduction, n'est pas de 100% (Figure 3.13). Bien que le peptide 2A allongé ayant été exploité dans notre construction soit plus performant que le peptide 2A standard de 19 acides aminés, celui-ci possède un taux d'efficacité variant de 80 à 99% chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Plucinak, Horken et al. 2015). Comme il a été mentionné plus tôt, puisque la xylanase recombinante doit passer par le système de transport vésiculaire pour être sécrétée hors de la microalgue, il serait aussi attendu de détecter un faible signal de XYN1 à partir de la fraction cytosolique.

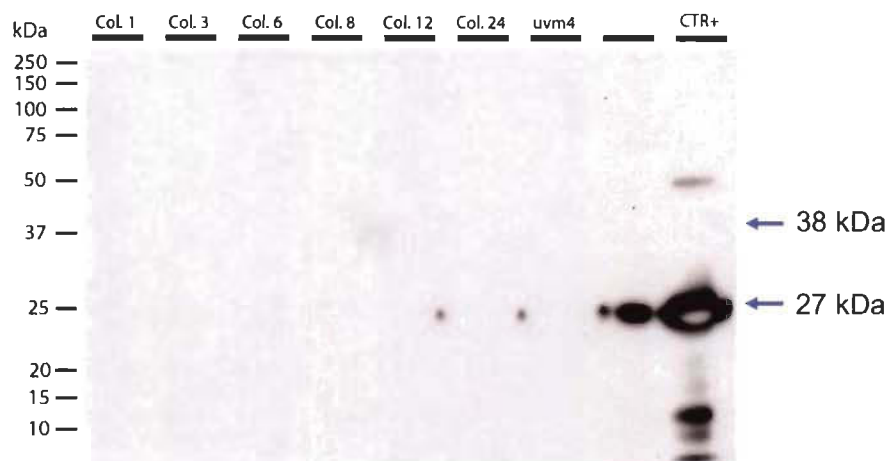


Figure 3.15 Immunobuvardage de type Western à partir des échantillons de protéines totales solubles cellulaire des transformants positifs. 25 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. Uvm4 : colonie mère non transformée. Ctr.+ : protéine contrôle de 27 kDa possédant un His-tag.

3.6.3 Fraction surnageant

Concernant la fraction des protéines du surnageant, 25 µg de protéines de chaque échantillon concentré ont été déposés dans les puits. Pour la coloration au bleu de Coomassie, il est à noter que les transformants 1, 8 et 12 n'ont pas pu être analysés. Généralement, lorsqu'une protéine recombinante est produite et sécrétée en grande quantité par un organisme hétérologue, il est possible d'observer directement sur le gel de Coomassie une bande plus intense à la taille attendue. Ceci a été le cas pour Molino et son équipe à partir d'une souche de *C. reinhardtii* sécrétant la mCherry (Molino, de Carvalho et al. 2018). Au contraire, nous n'observons pas de bandes fortement plus intenses à la taille de 27 kDa. De plus, le patron de migration des protéines du surnageant des transformants 3, 6 et 24 semblent similaires à celui de la colonie mère non transformée (Figure 3.16).

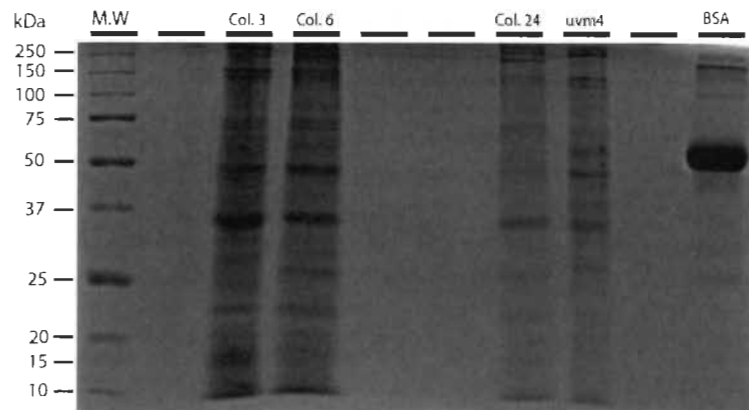


Figure 3.16 Gel SDS colorée au bleu de Coomassie des protéines totales de la fraction du surnageant des transformants positifs 3, 6 et 24. 25 μ g de protéines ont été déposés dans chaque puits. Uvm4 : colonie mère non transformée. BSA (Bovine Serum Albumine): contrôle positif (66,5 kDa).

Les protéines du surnageant des transformants positifs ayant été transférées sur membrane PVDF ont été révélées par immunobuvardage de type Western. Encore une fois, aucun signal n'a pu être détecté à la taille attendue de 27 kDa (Figure 3.17).

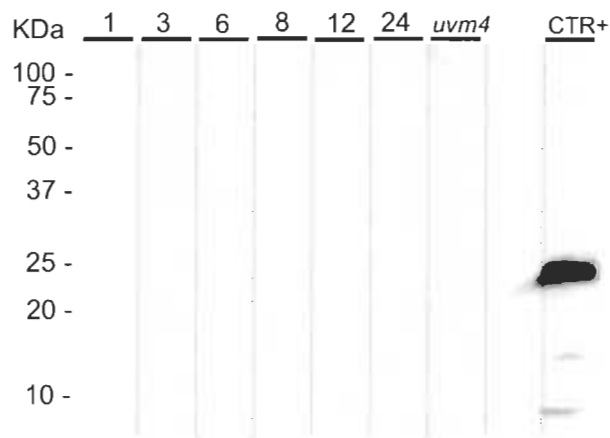


Figure 3.17 Immunobuvardage de type western à partir des échantillons de protéines du surnageant des transformants positifs. 25 μ g de protéines ont été déposés dans chaque puits. Uvm4 : colonie mère non transformée. Ctr.+ : protéine contrôle de 27 kDa possédant un His-tag.

En somme, nos résultats d'immunobuvardage de type western ne nous a pas permis de détecter la présence de xynI tant au niveau de la fraction cellulaire que de la fraction du surnageant.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Test de faisabilité

Les tests de faisabilité qui ont été effectués préalablement à la démarche expérimentale ont été concluants. Bien que le premier test ait été effectué de manière qualitatif, celui-ci a démontré que la présence de 0,1% de RBB-Xylane dans le milieu de culture gélosée n'affecte pas le taux de croissance de *Chlamydomonas* (uvm4). Ce résultat indique que l'exploitation du système de criblage via l'hydrolyse du RBB-Xylane n'engendre pas de temps d'attente ou de manipulations supplémentaires de la part de l'expérimentateur suite à la mise en culture des algues transformées. Ceci dit, il est toutefois possible que l'expression constitutive du transgène de la xylanase engendre un coût métabolique significatif, impactant du même coup le taux de croissance de l'algue. Sachant que la microalgue *Chlamydomonas* possède un potentiel biotechnologique de plus en plus grand, il est préférable de minimiser l'impact de l'expression d'un gène hétérologue sur le taux de croissance puisque la rentabilité y est directement dépendante. Dans ce sens, il serait pertinent de procéder à une évaluation plus précise de l'effet de notre système de criblage sur le taux de croissance de *C. reinhardtii*. Celle-ci pourrait être effectuée à partir d'une analyse quantitative comparative entre la courbe de croissance d'une culture liquide d'algues non transformées et celle d'une culture d'algues exprimant notre cassette d'expression sans GOI. Rasala et son équipe ont déjà réalisé ce type d'expérience afin de déterminer l'impact de l'expression de leur cassette d'expression *ble2A-PS-XYN1* sur la croissance de *C. reinhardtii* (Rasala, Lee et al. 2012). Selon leurs résultats, le taux de croissance entre la souche mère et la souche transformée n'est significativement pas différent. Bien que notre cassette d'expression soit quelque peu différente et que nous n'utilisons pas la même souche de *Chlamydomonas*, il est fortement probable que ce même résultat s'applique pour notre système de criblage.

En effet, il est fort probable que certaines algues soient aptes à produire la xylanase. Pour l'instant, le gène de la xylanase a été identifié seulement à partir du génome de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* (Cock, Sterck et al. 2010). Après avoir effectué un BLAST de la séquence peptidique de la xylanase (EC 3.2.1.8) sur l'ensemble des algues faisant partie de l'embranchement des Chlorophytes, aucune séquence homologue n'a été identifiée. Le même résultat a été obtenu à partir du génome de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce résultat est cohérent avec nos observations puisqu'aucun cercle de dégradation n'a été formé autour des colonies d'algues non transformées. Ceci assure une bonne spécificité de notre système de criblage. C'est-à-dire, que seules les colonies étant positivement transformées et sécrétant la xylanase recombinante dans leur milieu de culture porteront un cercle de dégradation. De ce fait, les chances que l'expérimentateur investisse du temps et des ressources inutilement sur un faux-positif sont minimisées.

Les microorganismes unicellulaires, lorsque cultivés sur milieu solide, forment des amas de cellules appelés des colonies. En fonction du type de microorganisme, de la souche, de l'environnement et de plusieurs autres facteurs abiotiques, ces colonies peuvent se présenter sous des morphologies variables. *C. reinhardtii* n'en fait pas exception (Bell 2013). Chez la levure, une étude a démontré que la présence ou l'absence de certains éléments nutritifs dans le milieu de culture gélosé engendrent des changements morphologiques des colonies de manière très distinctive. Après avoir identifié les gènes responsables de la morphologie atypique des colonies, ils ont constaté que la plupart d'entre eux étaient impliqués dans des voies de signalisation fortement conservées chez les eucaryotes et dans la réponse au stress (Granek et Magwene 2010). Dans le même ordre d'idées, il est possible qu'un changement de morphologie des colonies d'algues suite à l'ajout de RBB-Xylane puisse être un indicateur que celui-ci induit un stress aux algues. Dans les faits, suite à nos observations au binoculaire, il ne semble pas y avoir de différence au niveau de la morphologie des colonies de *C. reinhardtii* en présence ou non de RBB-Xylane.

La dernière expérience de faisabilité nous a permis de démontrer que la xylanase est en mesure d'hydrolyser le RBB-Xylane dans le milieu TAP de culture gélosée. La même

expérience a été effectuée selon deux conditions différentes. La première condition correspond aux valeurs de pH et de température optimale pour la croissance de *Chlamydomonas* soient 7 et 26°C, respectivement. La deuxième condition correspond au compromis entre les valeurs de pH et de température qui permettrait d'obtenir une activité enzymatique tout en offrant une bonne croissance à la microalgue. Le pH optimal de l'endo-1-4-β-xylanase M1 provenant de *Trichoderma viride* (EC 3.2.1.8) est d'environ 5. D'un autre côté, la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* est optimale à des pH > 6 et commence à diminuer sous des valeurs de pH d'environ 5,5 (Messerli, Amaral-Zettler et al. 2005). Dans ce sens, la valeur de pH conciliatoire qui a été déterminée est de 5,5. Concernant la température optimale de l'enzyme, sa valeur est de 50°C, mais reste très active à environ 40°C. Selon Vítová, Bišová et al. (2011) la température optimale pour la culture de *C. reinhardtii* se situe à environ 28°C. En augmentant la température jusqu'à 37°C, les auteurs ont constaté que la croissance ainsi que la division cellulaire des cellules d'algue étaient encore possibles. Ils ont toutefois noté qu'à partir de 39°C les cellules étaient capables de croître, mais que leur division était complètement arrêtée. Dans ce sens, la température compensatoire qui a été choisie est 37 °C. La raison qui nous a poussés à comparer ces deux conditions est dans le but d'optimiser la résolution de notre méthode de criblage. Sachant qu'il est possible d'améliorer l'activité catalytique de la xylanase et du même coup la sensibilité du système de criblage à partir d'un pH de 5,5 et d'une température de 37°C, les colonies positives pourront, une fois mures, être incubées à 37°C durant quelques heures afin d'obtenir des cercles de dégradation mieux définis. Ceci permettra d'optimiser la sélection des transformants positifs de meilleure qualité selon la taille du cercle de dégradation qu'ils arborent. Cette étape ne demande pas de temps ni de coûts additionnels et permet d'améliorer le système de criblage tout en conservant des conditions de croissance viables pour la microalgue. Bien que cette expérience ait été effectuée avec une xylanase purifiée provenant d'une espèce différente, soit *T. viride*, il est à noter que la séquence peptidique de XYN1 pour les deux espèces présente un pourcentage d'homologie de 100%.

Toutefois, bien que nos tests de faisabilité ont été concluants, ceux-ci nous ont aussi démontré que notre système de criblage possède des limitations. En effet, il peut être

visuellement difficile de différencier les tailles des halos lorsque leur concentration en enzymes se rapproche, ce qui se traduit par un manque de sensibilité. Ceci est de plus en plus vrai à des concentrations plus faibles. Plusieurs causes peuvent expliquer ce manque de sensibilité. Premièrement, le front du cercle de dégradation n'est pas toujours bien défini, ce qui peut engendrer une source de biais. Deuxièmement, la taille des cercles de dégradation est dépendante à la capacité de diffusion de l'enzyme dans le milieu. Dans ce sens, bien que les géloses soient soigneusement préparées selon la même recette, il est possible que la variabilité de densité intra et inter gélose offre des capacités de diffusion variables à la xylanase, ce qui peut affecter la sensibilité du système de détection.

Un moyen qui pourrait être utilisé pour améliorer le système de criblage serait de le rendre quantitatif via un système d'imagerie. Tout d'abord, il faut comprendre que lorsque la microalgue sécrète l'enzyme dans son milieu extracellulaire, celle-ci diffuse selon l'axe des X, Y et Z. Dans ce sens, en considérant la diffusion de la xylanase en profondeur, cela nous permet d'être plus représentatif de la réalité. Ceci est possible en mesurant non seulement la largeur, mais aussi l'intensité du signal (blanc) du halo sur la gélose RBB-Xylane (noir). Comme dans tout système d'imagerie, le bruit de fond est un élément important à considérer. Dans notre cas, puisque la gélose laisse passer la lumière, le bruit de fond est dépendant de l'épaisseur de celle-ci. Plus la gélose est mince, plus le halo est perdu dans le bruit de fond. Au contraire, plus la gélose est épaisse moins il y a de bruit de fond. Toutefois, une gélose trop épaisse laisse passer moins de lumière et peut donc réduire la résolution du système de détection en étouffant les halos. Il faut donc trouver le ratio signal/bruit de fond optimal afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible et de l'adapter selon les concentrations d'enzymes. En d'autres mots, une épaisseur de gélose plus élevée devrait être utilisée pour des concentrations d'enzymes plus élevées. L'objectif est d'obtenir un signal sub-saturé (blanc) des halos. En sachant que la sensibilité de détection du système de criblage est dépendante de l'épaisseur de la gélose (bruit de fond), il est essentiel de comparer des halos possédant le même bruit de fond. En réalité, la force de tension de surface du gel liquide dans la boîte de pétrie cause naturellement une forme concave, formant ainsi une épaisseur sous forme de gradient décroissant du pourtour vers le centre. Ce phénomène explique pourquoi nous observons des cercles de dégradation

plus intenses au centre des gélouses que sur les pourtours. Ce gradient représente effectivement une limitation, mais peut être minimisé en effectuant une normalisation avec un signal de bruit de fond mesuré au même endroit à partir d'une gélouse contrôle de même épaisseur. Bien que ce type de logiciel ne soit pas encore disponible, un prototype a été conçu à partir du logiciel d'imagerie ImageJ et de l'option "*Concentric circles*". Brièvement, une image en noir et blanc de la gélouse contenant des cercles de dégradation est importée dans le logiciel. Grâce à l'option "*Concentric circle*", il est possible de mesurer le gradient d'intensité (blanc/noir) autour de la colonie. Les données sont ensuite importées et traitées dans Excel, afin d'y construire la courbe du gradient d'intensité du signal en fonction de la distance radiale du cercle de dégradation de chaque colonie positive. La valeur moyenne de l'intensité du signal de fond est mesurée à partir de la gélouse contrôle et est utilisée comme ligne de base. L'aire sous la courbe est ensuite calculée. Cette aire sous la courbe peut donc être employée comme valeur indicative du niveau d'expression du transformant. Ce système d'imagerie adapté à notre système de criblage permettrait de rendre celui-ci plus juste, plus reproductible et plus quantitatif. Finalement, il serait pertinent à l'avenir de normaliser la valeur de l'aire sous courbe avec la taille de la colonie.

Toutefois, bien que le système de criblage reste pour l'instant semi-quantitatif, celui-ci offre tout de même une bonne compatibilité avec la microalgue *C. reinhardtii* et offre une première sélection rapide des meilleurs transformants qui pourront être utilisés pour d'éventuelles analyses.

4.2 Électroporation

Lorsqu'une cellule est exposée à un champ électrique suffisamment intense, des pores aqueux se forment dans la membrane plasmique, ce qui a comme effet d'augmenter sa perméabilité. Si le voltage du champ électrique n'est ni trop élevé et ni trop long, la membrane plasmide peut revenir à son état normal. Ce processus transitoire est appelé électroperméabilisation ou simplement électroporation (Apollonio, Liberti et al. 2012). Selon la théorie, la probabilité d'occurrence de ces pores membranaires augmente avec le

voltage. Désormais, l'électroporation est communément utilisée pour introduire des molécules hydrophiles tel que l'ADN dans plusieurs types de cellules (Escoffre, Portet et al. 2009). La microalgue *Chlamydomonas* possède aussi une paroi cellulaire. Celle-ci est constituée de glycoprotéines et de sucres tels que des arabinoses, des galactoses et des mannoses (Adair, Steinmetz et al. 1987). Cette barrière additionnelle représente une limitation pour le transport de molécules à l'intérieure de la cellule. En effet, il a été démontré que l'utilisation de souches mutantes uvm4, dépourvues de parois cellulaires, pour l'électroporation améliore l'incorporation de macromolécules dans *Chlamydomonas reinhardtii* (Azencott, Peter et al. 2007). En contrepartie, les cellules sans paroi cellulaire semblent être plus susceptibles au haut voltage et offrent donc des taux de survie post électroporation plus faibles. Dans tous les cas, le principal défi de cette méthode est de trouver le juste équilibre entre l'efficacité de transfection et la survie des cellules après le pulse électrique. Depuis que *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme organisme modèle en biotechnologie végétale, plusieurs chercheurs ont tenté de développer des techniques d'électroporation pour y introduire leurs transgènes (Tableau 4.1). On retrouve donc dans la littérature une multitude de protocoles utilisant des techniques et des paramètres d'électroporation différents. Bien que les principaux paramètres découlant des différents protocoles soient le voltage, la résistance et la capacitance de la solution d'électroporation, il semble que pour obtenir une bonne efficacité de transfection par électroporation, plusieurs autres variables doivent être prises en compte. Par exemple, la concentration des cellules d'algue, le type d'électroporateur, le type de pulse électrique, la souche utilisée, la composition physico-chimique et la température du milieu d'électroporation, la rapidité des manipulations, la quantité d'ADN, la durée de récupération des cellules post-électroporation et la concentration d'antibiotique sont tous des exemples de paramètres additionnels à considérer. Par manque d'expérience et de résultats positifs, nous avons, au cours de ce projet, consacré beaucoup de temps dans l'optimisation de notre procédure d'électroporation. Le protocole #1 est donc inspiré de plusieurs sources et est le résultat de plusieurs tentatives. À noter que celui-ci a été optimisé pour l'utilisation de la souche uvm4. Dans cet ordre d'idées, la raison pour laquelle nous avons obtenu aucune colonie avec le protocole d'électroporation #2 est peut-être due à la différence de souche utilisée entre celle de l'auteur et la nôtre (Molino, de

Carvalho et al. 2018). Contrairement à nous, Molino et son équipe ont utilisé une souche de *C. reinhardtii* pourvue d'une paroi cellulaire intacte soit la souche cc1690. Étant moins résistante au haut voltage, il est possible que la souche uvm4, qui est dépourvue de paroi cellulaire, soit plus sensible à un champ électrique de 2000 V/cm. Toutefois, dans leur article, Jeon, Suresh et al. (2013) ont eux aussi testé une souche sans paroi cellulaire avec un champ électrique de 2000V/cm selon différentes durées de pulse. À 5 ms, soit une valeur se rapprochant de la nôtre, ils ont obtenu un taux de transformation d'environ 40 %. Il faut noter que leur protocole est très différent de celui que Molino et son équipe utilisent. En conclusion, considérant les nombreuses variables pouvant affecter le succès de l'électroporation ainsi que les nombreux protocoles disponibles, il est à mon avis préférable d'optimiser son propre protocole comme il a été effectué lors de ce projet. Néanmoins, nos tests d'électroporation avec la souche uvm4 nous ont finalement conduits à utiliser les mêmes paramètres que ceux proposés par le fournisseur Invitrogen, soient 500V, 50 μ F et 800 Ω .

Tableau 4.1

Liste des différents paramètres d'électroporation utilisés par plusieurs chercheurs pour la transfection du génome nucléaire de différentes souches de *Chlamydomonas reinhardtii*

No.	Souche	Gène	Paramètres	Constante de temps (ms)	Milieu d'électroporation	Auteurs
1	CC1690	500 - 1000 ng (double digestion)	V : 2000 V/cm μ F : 25 Ω : ∞	N/A	250 μ l TAP 40 mM sucrose	(Rasala, Lee et al. 2012, Molino, de Carvalho et al. 2018)
2	CC124	4 μ g (linéarisé)	V : 2000 V/cm μ F : 25 Ω : ∞	N/A	125 μ l solution EP (30 mM HEPES, 5 mM potassium acétate, 1mM calcium acetate, 60 mM sucrose, pH 7,4	(Kasai et Harayama 2016)
3	CC4350	4 μ g (linéarisé)	V : 700 V/cm μ F : 600 Ω : ∞	N/A	125 μ l solution EP	Kasai et Harayama (2016)
4	uvm4 uvm11	300 ng (linéarisé)	V : 1750 V/cm μ F : 50 Ω : ∞	N/A	250 μ l TAP 50 mM sucrose	(Shimogawara, Fujiwara et al. 1998, Kong, Yamasaki et al. 2015)

Tableau 4.1 - Suite

No.	Souche	Gène	Paramètres	Constante de temps (ms)	Milieu d'électroporation	Auteurs
5	uvm4 CC125	400 ng (linéarisé)	V : 1500 V/cm μ F : N/A Ω : 500-600	8 ms	40 μ l TAP 40 mM sucrose	(Yamano, Iguchi et al. 2013, Kajikawa, Kinohira et al. 2015)
6	uvm4 uvm11	400 ng (linéarisé)	V : 2000 V/cm μ F : 25 Ω : ∞	N/A	250 μ l TAP 40 mM sucrose	Connolly (2014)
7	CC3395 CC425	2,5 μ g	V : 1900 – 2400 V/cm μ F : 10 Ω : N/A	5 - 6 ms	250 μ l TAP 40 mM sucrose	Shimogawara, Fujiwara et al. (1998)
8	137c	2 μ g	V : 1500 V/cm μ F : 50 Ω : ∞	N/A	250 μ l TAP 40 mM sucrose	(Technologies 2013)
9	137c	2-4 μ g	V : 1250 V/cm μ F : 50 Ω : 800	30 ms	GeneArt™ MAX Efficiency™ Transformation Reagent (Cat. No. A24229)	(Technologies 2016)

4.3 Immunobuvardage

Pour la fraction cytosolique, les cultures d'algues ont été menées jusqu'à une phase exponentielle tardive soit à environ 1×10^7 cell/ml (Neupert, Karcher et al. 2009). Cette densité de cellules a été choisie puisqu'elle nous permet d'extraire les protéines totales solubles à partir d'un maximum de cellules par volume. De plus, en demeurant dans la phase de croissance exponentielle, on assume que le taux de mort cellulaire est négligeable, ce qui limite la perte de protéines cytosoliques dans le surnageant. D'un autre côté, les cultures des fractions du surnageant ont été menées jusqu'au début de la phase stationnaire, soit environ $2-3 \times 10^7$ cell/mL, afin de maximiser l'accumulation des protéines extracellulaires dans le surnageant. À ce stade-ci, bien que nous assumons que la lyse cellulaire est négligeable, il serait tout de même pertinent d'utiliser, à titre de contrôle, un transformant qui ne possède pas de peptide signal devant *XYN1*. Ce contrôle nous permettrait de confirmer que le signal obtenu par immunobuvardage de type Western est réellement issu de la sécrétion de *XYN1* et non de la lyse possible de quelques cellules

dans la culture. Similairement, Mayfield et son équipe ont mesuré l'activité enzymatique de la xylanase recombinante sans peptide signal. Ils ont ensuite calculé le pourcentage d'activité enzymatique issu du cytosol et du surnageant. Leurs résultats démontrent que même sans peptide signal, environ 15% de l'activité totale de la xylanase recombinante provenait du surnageant (Rasala, Lee et al. 2012). Toutefois, ce pourcentage n'a pas été suffisant pour obtenir un signal lors de leur immunobuvardage à partir du surnageant. Ce résultat nous confirme que l'absence de signaux lors de l'immunobuvardage de type Western n'est pas synonyme d'absence de la protéine xylanase. Le même constat a aussi été observé pour Molino, de Carvalho et al. (2018). Ils ont mesuré de la fluorescence de la mCherry issue du surnageant à partir d'une lignée sans PS. Ils évoquent eux aussi l'hypothèse de lyse cellulaire due à des conditions de croissance sub-optimales. Toutefois, malgré ce constat, leurs résultats d'immunobuvardage présentent aucun signal (Molino, de Carvalho et al. 2018) . Dans tous les cas, bien que nous n'ayons pas utilisé un tel contrôle, il reste que nos résultats d'immunobuvardage indiquent que nous n'avons pas détecté xyn1 ni à partir de la fraction cellulaire, ni à partir de la fraction du surnageant. Cette constatation nous laisse donc sur plusieurs pistes de réflexion et d'hypothèses qui pourraient expliquer ces résultats négatifs.

4.4 Hypothèses

Selon les résultats de séquençage par Génome Québec, les colonies positives qui ont été sélectionnées ont stablement intégré notre cassette d'expression. Ces mêmes résultats nous ont aussi confirmé que la séquence ayant été transfectée dans leur génome ne possède aucune mutation, insertion ou délétion. De ce fait, il est surprenant de constater que nos résultats d'expression et d'analyse protéique ne sont pas concluants. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de détection de xylanase à partir des deux fractions.

4.4.1 Changement de cadre de lecture

L'anticorps ayant été employé pour détecter XYN1 est un Anti-His. L'épitope His a stratégiquement été positionné à l'extrémité 3' du transgène afin de s'assurer que l'entièreté de notre transgène ait été lu par le ribosome selon le bon cadre de lecture.

Premièrement, l'épissage alternatif est un mécanisme pouvant affecter l'ORF de l'ARNm. L'absence de l'épissage du premier intron lors de la maturation de l'ARNm du transgène pC3_Xyn1 engendrerait un changement dans le cadre de lecture de l'ARNm, ce qui mènerait à la synthèse d'un polypeptide entièrement différent et sans épitope His. Ce premier scénario expliquerait aussi pourquoi nous n'avons pas été en mesure d'amplifier une bande d'une taille de 508 nt à partir des échantillons d'ADNc. Toutefois, cette explication est très peu probable pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ce problème n'a jamais été relevé dans aucune publication. Deuxièmement, seulement 3% des gènes chez *C. reinhardtii* subissent de l'épissage alternatif (Labadorf, Link et al. 2010). En plus de ce faible pourcentage, les chances que l'épissage du premier intron ne survienne jamais est d'autant plus faible. Finalement, il est important de mentionner que la cassette d'expression du gène de résistance à l'hygromycine, (aph7) qui se situe immédiatement après notre transgène sur le vecteur pC3_Xyn1, contient aussi le premier intron du gène *RBCS2*. De la même manière, si l'épissage du premier intron ne serait pas effectué, la protéine de résistance à l'hygromycine ne serait, elle aussi, pas synthétisée. Or, nos résultats de transfection démontrent clairement que nos transformants positifs sont résistants à l'hygromycine, ce qui nous confirme que le premier intron à partir de la cassette d'expression du gène aph7 a bel et bien été épissé correctement. Pour ces raisons, l'hypothèse du changement de cadre de lecture causé par un mauvais épissage de l'ARNm peut être écarté.

4.4.2 Mauvais fonctionnement du peptide 2A

Depuis leur découverte en 1994 (Ryan et Drew 1994), les peptides 2A ont été intensivement étudiés et utilisés pour la construction de cassettes d'expression bicistroniques. Ceux-ci ont démontré leur compatibilité dans tous les types de système eucaryote (Szymczak-Workman, Vignali et al. 2012). Lors du "ribosome skipping" le clivage du peptide FMDV 2A s'effectue à l'extrémité C-terminal dans un site hautement conservé, soit entre le résidu glycine et la dernière proline (Asp-Val/Ile-Glu-Asn-Pro-Gly-↓-Pro). La majeure partie du peptide 2A reste donc liée en C-terminal de la protéine située en amont du peptide 2A alors que la dernière proline reste liée à la protéine en aval du

peptide 2A. L'ajout d'une proline en N-terminale du peptide signal peut peut-être avoir affecté son bon fonctionnement. Toutefois, lors de la conception de la cassette d'expression, cet ajout a été pris en considération. En effet, selon le résultat obtenu par le logiciel SignalP, l'ajout de la proline en N-terminal n'empêche pas au site de clivage du peptide signal ARS1 de fonctionner. De plus, Rasala et son équipe ont utilisé exactement le même peptide signal en amont d'un peptide 2A pour sécréter la xylanase à partir du génome nucléaire de *C. reinhardtii* (Rasala, Lee et al. 2012). Il semble donc peu probable que le problème de production de la xylanase soit dû à la présence d'une proline additionnelle en N-terminale du peptide signal.

Une autre explication possible est le fait que le site multiple de clonage, positionné en amont du peptide 2A, soit vide. En effet, au meilleur de nos connaissances, aucun auteur exploite un système d'expression bicistronique composé d'un seul gène. Dans tous les cas, les auteurs qui utilisent une cassette d'expression constituée d'un peptide 2A incluent 2 gènes à leur construction, soit un gène en aval et en amont du peptide 2A (gène-2A-gène). Cette structure est d'ailleurs plus représentative de celle retrouvée en nature. Or, l'absence d'un gène en amont du peptide 2A peut affecter le bon fonctionnement de celui-ci lors de la traduction.

En effet, il a été récemment démontré que la portion C-terminal de la protéine en amont du peptide 2A peut influencer l'efficacité de clivage de celui-ci (de Felipe, Luke et al. 2010). Le modèle du mécanisme du "*ribosome skipping*" le plus accepté prédit que, lorsque l'ARN^t^{Gly} est au site P du ribosome, la portion N-terminal du peptide 2A forme une hélice-alpha qui interagit directement avec le tunnel de sortie du ribosome. Cette interaction a comme effet de bloquer l'élongation en modifiant la conformation du ribosome au niveau du site P. Des facteurs traductionnels interviennent par la suite afin de relancer la traduction au site A du ribosome où se trouve la dernière proline du peptide 2A. Chez les eucaryotes, le tunnel de sortie peut contenir de 30 à 40 a.a. Dans ce sens, selon de Felipe, Luke et al. (2010), tous les résidus présents dans le tunnel peuvent affecter le bon fonctionnement de la traduction du peptide 2A. Dans ce sens, l'utilisation de peptides 2A de courte taille offre généralement des taux d'efficacité plus faibles puisque

des résidus de la portion C-terminal du peptide en amont du 2A peuvent inhiber le clivage. Lors de la conception de pC3_Xyn1, nous avons volontairement utilisé une version du peptide FMDV 2A allongé de 39 a.a. Puisque celui-ci occupe pratiquement tout l'espace du tunnel de sortie du ribosome, il y a peu de chances que la portion C-terminale du peptide, en amont du 2A, affecte la conformité du ribosome. De plus, il est peu probable que la portion C-terminal du peptide, en amont du 2A, puisse inhiber complètement le clivage (de Felipe, Luke et al. 2010, Minskaia, Nicholson et al. 2013). Et si tel avait été le cas, nous aurions tout de même dû détecter une bande à 38 kDa lors de l'immunobuvardage de type western à partir de la fraction cellulaire.

Bien que selon la théorie et la littérature, la cause du problème ne semble pas être due au mauvais fonctionnement du peptide 2A, il reste que la présence de seulement 30 acides aminés en amont du peptide 2A est relativement courte. Il serait donc, selon moi, pertinent de cloner une séquence codante dans le MCS afin d'expérimenter le système de criblage.

4.4.3 Mauvais repliement de Xyn1

Lors de la conception bio-informatique de pC3_Xyn1, des épitopes ont été placés directement en aval du MCS et du gène rapporteur afin de faciliter leur purification. Un seul épitope HA (YPYDVPDYA) a été positionné en C-terminal du MCS tandis que 3 épitopes ont été placés en C-terminal du gène *XYN1*, soient un FLAG-Tag (DYKDDDDK), un MAT-Tag (HNHRHKHTS) et un HIS-Tag (6xH). Étant espacés par des "Linker" de quelques a.a., un total de 38 résidus est ajouté à l'extrémité C-terminal de *XYN1*. Il est possible que cette addition puisse engendrer des problèmes de repliement de la xylanase recombinante. Dans cet ordre d'idées, celle-ci serait envoyée vers le lysosome afin d'y être dégradée (Jackson et Hewitt 2016). Cependant, il est important de mentionner que A. Rasala et son équipe ont eux aussi ajouté 31 résidus en C-terminal de leur xylanase recombinante. Vraisemblablement, cette addition n'a pas eu d'effets sur le repliement de xyn1 puisque la xylanase extracellulaire recombinante qu'ils ont isolée démontre une bonne activité enzymatique (Rasala, Lee et al. 2012). Leurs résultats positifs tendent à

confirmer que la présence additionnelle des 3 épitopes en C-terminal de XYN1 n'affecte pas de manière significative son bon repliement.

4.5 Améliorations

Avec une nouvelle perspective de ce projet de maîtrise, plusieurs améliorations seraient à apporter. La prochaine section énumère brièvement quelques considérations qui devraient être prises en compte lors d'un futur projet concernant le génie génique à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.5.1 Optimisation de la cassette d'expression

Récemment, une équipe de chercheurs a développé un outil informatique permettant d'analyser la séquence d'ADN entière d'un transgène afin d'optimiser son expression à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas* (Weiner, Atar et al. 2018). Leur procédure d'amélioration est composée de 3 étapes : l'optimisation des codons de la séquence selon l'utilisation préférentielle des codons de *Chlamydomonas* ; l'élimination des sites d'épissage non désirés ; l'optimisation de l'énergie libre à partir du site d'initiation de la traduction. Ce programme bio-informatique devrait être exploité afin d'améliorer la reconnaissance du transgène par la machinerie génétique de *C. reinhardtii*.

Bien que l'utilisation de peptides 2A de plus longue taille puisse offrir une meilleure efficacité de clivage du polypeptide lors de la traduction, ceux-ci peuvent cependant affecter la conformité de la protéine d'intérêt. En effet, quelques exemples issus de la littérature démontrent que la portion N-terminal du peptide 2A, qui reste liée à la portion C-terminal de la protéine d'intérêt, peut modifier sa structure et donc sa fonction. Dans notre cas, 38 résidus sont ajoutés à la protéine d'intérêt suite au "Ribosome Skipping". Dépendamment de certaines protéines recombinantes, cette addition peut avoir une influence significative sur son activité. Une stratégie pouvant être utilisée, pour éliminer l'ajout de ces acides aminés résiduels, est l'incorporation d'un site de clivage protéolytique de la furine entre la portion C-terminal de la protéine d'intérêt et la portion N-terminal du peptide 2A (Yang, Cohen et al. 2008, Minskaia, Nicholson et al. 2013). La furine est une

protéinase abondante dans l'appareil de Golgi. Dans ce sens, cet outil devrait être utilisé seulement pour des protéines d'intérêt possédant un peptide signal.

4.5.2 Optimisation de la démarche expérimentale

Bien que plusieurs efforts soient déployés pour optimiser un transgène pour le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, il reste que la majeure partie de l'ADN que constitue le vecteur d'expression est exogène et peut donc affecter négativement l'expression du transgène. Sachant que *C. reinhardtii* est sensible à l'ADN étranger, il semble pertinent de procéder à une double digestion afin de purifier la portion du vecteur comportant le transgène optimisé pC3_Xyn1 ainsi que la cassette d'expression du gène de résistance à l'hygromycine. Cela dans le but d'éliminer l'ADN non désiré. Bien qu'il a déjà été démontré qu'une telle manipulation améliorerait le taux de transfection, il n'en n'est rien concernant le taux d'expression (Rasala, Lee et al. 2012).

Au cours de ce projet, aucun vecteur n'a été employé comme contrôle positif. Un tel vecteur aurait dû être utilisé afin de valider chacune des étapes de notre démarche expérimentale. Bien que nous ne possédions aucun vecteur d'expression nucléaire ayant été testé au laboratoire, il aurait été judicieux de s'en procurer un à partir de la banque publique *Chlamydomonas* Resource Center. Les vecteurs pJP22 et pPY1, publiés par Molino, de Carvalho et al. (2018) et Plucinak, Horken et al. (2015) respectivement, auraient été de bons choix de vecteurs d'expression contrôle puisque que leur cassette d'expression comporte plusieurs éléments similaires à notre construction pC3_Xyn1.

Bien que nous n'ayons pas identifié XYN1 par immunobuvardage de type Western, il aurait été intéressant d'ajouter une étape d'essais enzymatiques de la xylanase à partir des fractions protéiques cellulaires et du surnageant. Le kit d'essai enzymatique EnzChek™ Ultra Xylanase commercialisé par Thermo Fisher serait approprié pour cette expérience. En effet, A. Rasala et son équipe, à partir de lignées transgéniques exprimant xyn1 cytosolique, ont pu mesurer une faible activité enzymatique à partir de la fraction du surnageant alors qu'ils n'avaient rien détecté par immunobuvardage de type western.

Un autre élément qui aurait pu être ajouté lors de l'immunobuvardage de type Western, à partir de la fraction cellulaire, est l'utilisation d'un anticorps spécifique au peptide 2A. Cette expérience additionnelle nous permettrait de vérifier si le peptide 2A est fonctionnel ou non en l'absence de gènes dans le MCS. Premièrement, puisque l'épitope 2A se situe au début du polypeptide et que celui du His-Tag à la toute fin, dans un cas où nous détecterions un signal à partir de l'anticorps 2A et aucune à partir de l'anticorps His, cela nous informerait sur un possible problème de changement de cadre de lecture du peptide 2A lors de la traduction.

4.6 Perspectives

Tout d'abord, afin de simplement tester le système de criblage des colonies d'algues exprimant un transgène à partir d'une gélose RBB-xylan, nous avons comme objectif de cloner le gène *XYNI* dans un vecteur d'expression nucléaire fonctionnel ayant déjà été employé pour la sécrétion d'une protéine recombinante à partir de *C. reinhardtii*. Le vecteur pJP22 publié par Molino, de Carvalho et al. (2018) sera utilisé à cette fin. Cette première étape nous permettra, de manière conservatrice, de répondre à la première hypothèse de notre deuxième objectif, c'est-à-dire que les colonies présentant un cercle de dégradation auront, dans 100% des cas, intégré de manière stable notre transgène. Ceci sera confirmé par PCR.

En deuxième lieu, suite au succès de la sécrétion de XYNI à partir du vecteur d'expression contrôle pJP22, nous avons comme objectif de reconstruire le vecteur pC3_Xyn1, tout en y apportant les différentes améliorations mentionnées à la section précédente. Bien que l'objectif ultime est d'intégrer un gène impliqué dans la voie de synthèse d'un MSP, le gène qui serait inséré au MCS serait un autre gène rapporteur faisant partie du tableau 1.2. Le fait d'exprimer un autre gène rapporteur en amont du peptide 2A nous offre l'opportunité de rapidement déterminer si la cassette d'expression bi-cistronique fonctionne bien ou non. Lorsque la nouvelle version de la cassette d'expression pC3_Xyn1 sera fonctionnelle, 20 colonies positives présentant des tailles de cercle de dégradations variables seront sélectionnées. Les niveaux d'expression de chaque

colonie positive sélectionnée seront mesurés par qRT-PCR et via un essai enzymatique (EnzChek™ Ultra Xylanease). Ces résultats seront ensuite comparés avec les tailles des halos afin de vérifier la corrélation entre la taille des halos et le niveau d'expression du transgène. Cette étape nous permettra de répondre à la deuxième hypothèse de notre deuxième objectif, c'est-à-dire qu'il sera possible de sélectionner les transformants exprimant davantage notre transgène en fonction de leur taille de cercle de dégradation.

En troisième lieu, la nouvelle cassette d'expression pC3_Xyn1 sera optimisée à l'aide du nouveau promoteur synthétique fort *SAP11* ainsi qu'avec l'introduction des 3 introns endogéniques du gène *RBCS2* selon l'ordre natif du gène. 20 colonies positives des constructions pC3_Xyn1 et pC3_Xyn_Opt seront sélectionnées aléatoirement. La moyenne des tailles des halos issus des deux constructions sera comparée afin de vérifier si la cassette d'expression pC3_Xyn1_Opt optimisée confère significativement de meilleurs niveaux d'expression du transgène. Cette étape nous permettra de répondre à l'hypothèse de notre objectif final, c'est-à-dire que les colonies transformées avec la cassette d'expression optimisée posséderont des plages de lyse de plus grande taille comparativement à celles transformées avec la cassette d'expression de base.

Finalement, la dernière perspective serait d'introduire, dans le MCS, un gène d'intérêt impliqué dans une voie métabolique d'origine végétale. Cette étape permettrait de répondre à l'objectif ultime de ce projet de maîtrise qui consiste à évaluer la pertinence de notre vecteur d'expression en biologie synthétique pour la reconstruction de voies métaboliques spécialisées d'origine végétale à partir du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Considérant le potentiel grandissant de la microalgue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* à titre de plateforme de production de composés d'origine végétale à haute valeur, plusieurs chercheurs tentent d'exploiter le génome nucléaire de celle-ci pour l'expression de transgènes. Cependant, l'obtention de haut niveau d'expression ainsi que la variabilité de ceux-ci entre les transformants restent des défis majeurs que doit surmonter la communauté scientifique. Pour trouver un transformant exprimant davantage un transgène, les chercheurs doivent cribler un grand nombre de colonies positives. Dans le but d'améliorer et d'accélérer l'identification d'un tel transformant, ce projet de maîtrise a présenté un nouveau système de criblage pour l'exploitation du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. Grâce un essai enzymatique colorimétrique, ce système offre la possibilité de rapidement et semi-quantitativement sélectionner les meilleurs transformants d'algues directement sur le milieu de culture solide. Pour ce faire, une cassette d'expression bi-cistronique comportant le gène de la xylanase à titre de rapporteur a été conçue par bio-informatique. Celle-ci a ensuite été clonée dans un vecteur d'expression afin d'être transfectée dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Quelques colonies d'algues positivement transformées ont ensuite été analysées afin de valider notre système de criblage.

En regard avec nos objectifs initiaux, seul le premier objectif a été complété. En effet nos tests de faisabilité ont confirmé que le système de criblage colorimétrique sur gélose TAP + RBB-xylan à partir du gène rapporteur de xylanase est compatible avec la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. Bien que nous n'ayons pas pu adresser complètement nos autres objectifs, nos travaux de recherche nous ont toutefois permis d'enrichir nos connaissances et nos compétences concernant la manipulation du génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Tout d'abord, le vecteur d'expression pC3_Xyn1 qui a été conçu et construit représente un nouvel outil génétique disponible pour le laboratoire.

Possédant plusieurs sites de restrictions uniques, celui peut être exploité comme vecteur de base afin d'être modifié ou amélioré. En second lieu, les nombreuses optimisations apportées au protocole de transfection par électroporation de la souche uvm4 ont permis d'obtenir une bonne efficacité de transformation. En effet, 100% des colonies positives (n=90) qui ont été sélectionnées et réensemencées sur un milieu de sélection à l'hygromycine ont réussi à croître normalement. Ceci indique que tous ces transformants positifs ont intégré notre vecteur d'expression pC3_Xyn1 dans leur génome nucléaire et qu'ils expriment correctement le gène de résistance à l'hygromycine. Toutefois, bien que la présence de *XYN1* dans le génome des transformants positifs ait été confirmé par PCR, aucun ARNm du transgène et aucune xylanase (*XYN1*) n'a pu être détecté par PCR et immunobuvardage de type Western respectivement. Ces résultats supportent l'hypothèse que notre cassette d'expression pC3_Xyn1 comporte une problématique au niveau de sa séquence ce qui l'empêche d'être correctement exprimé. Pour cette raison, notre système de criblage n'a pas pu être entièrement testé et utilisé pour le criblage des transformants positifs de meilleure qualité en fonction de la taille de leur halo. Malgré ce fait, nos expériences de test de faisabilité ainsi que la littérature soutiennent l'idée que le système de criblage décrit lors de projet de maîtrise serait possible. C'est pourquoi d'autres tentatives devraient être réalisées afin d'identifier le présent problème. En effet, un tel système de criblage visuel serait très apprécié par la communauté de chercheurs travaillant avec *C. reinhardtii*.

ANNEXE A

Tableau ••1

Liste des différentes amorces utilisées lors de ce projet de recherche

Noms	Séquences
pC3_lin_773-774_F	CCGCTCCGTGTAAATGG
pC3_lin_773-774_R	AATCATATGGCGGCCG
X1_pCcomp_amp_F	gcagcggccgcatatgattTACCCATACGATGTTCCAG
X1_pCcomp_amp_R	cctccatttacaggagcggGGATCCTTACGTATGGTG
pChlamy_3.1_F	TTGCAACCCTTATCCGGAAGC
pChlamy_3.1_R	AACGAGCGCCTCCATTTACAC
Col_PCR_pC3_Xyn1_F	GCTCGTTTAGCGTCAATTCC
Col_PCR_pC3_Xyn1_R	AAGTGGTTCTGGACGGTGAC
qNuc_PGK_F	CCTGGTAAGAGATTGTGCTGTG
qNuc_PGK_R	GTGGTGGAACGAGAAACCTATG
Actin_F	CGACGAGGCGCAGTCCAAGCGC
Actin_R	CAGAGTCCAGCACGATACCG

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abatemarco, J., A. Hill et S. Alper Hal (2013). "Expanding the metabolic engineering toolbox with directed evolution." Biotechnology Journal **8**(12): 1397-1410.
- Adair, W. S., S. A. Steinmetz, D. M. Mattson, U. W. Goodenough et J. E. Heuser (1987). "Nucleated assembly of Chlamydomonas and Volvox cell walls." The Journal of Cell Biology **105**(5): 2373.
- Ajikumar, P. K., W.-H. Xiao, K. E. J. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T. H. Phon, B. Pfeifer et G. Stephanopoulos (2010). "Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in Escherichia coli." Science **330**(6000): 70-74.
- Apollonio, F., M. Liberti, P. Marracino et L. Mir (2012). Electroporation mechanism: Review of molecular models based on computer simulation. 2012 6th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP).
- Arber, W. et S. Linn (1969). "DNA Modification and Restriction." Annual Review of Biochemistry **38**(1): 467-500.
- Azencott, H. R., G. F. Peter et M. R. Prausnitz (2007). "Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication." Ultrasound in medicine & biology **33**(11): 1805-1817.
- Barahimipour, R., D. Strenkert, J. Neupert, M. Schroda, S. S. Merchant et R. Bock (2015). "Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga Chlamydomonas reinhardtii." The Plant Journal **84**(4): 704-717.
- Bell, G. (2013). "The incidental response to uniform natural selection." Biology Letters **9**(4).
- Berthold, P., R. Schmitt et W. Mages (2002). "An Engineered Streptomyces hygroscopicus aph 7" Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii." Protist **153**(4): 401-412.
- Biely, P., D. Mislovičová et R. Toman (1985). "Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases." Analytical Biochemistry **144**(1): 142-146.

- Biely, P., D. Mislovičová et R. Toman (1988). "Remazol Brilliant Blue-xylan: A soluble chromogenic substrate for xylanases." Methods in Enzymology **160**: 536-541.
- Blaby, I. K. et C. E. Blaby-Haas (2018). Gene Expression Analysis by Arylsulfatase Assays in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Reporter Gene Assays: Methods and Protocols. R. Damoiseaux and S. Hasson. New York, NY, Springer New York: 149-161.
- Blaby, I. K., C. E. Blaby-Haas, N. Tourasse, E. F. Y. Hom, D. Lopez, M. Aksoy, A. Grossman, J. Umen, S. Dutcher, M. Porter, S. King, G. B. Witman, M. Stanke, E. H. Harris, D. Goodstein, J. Grimwood, J. Schmutz, O. Vallon, S. S. Merchant et S. Prochnik (2014). "The *Chlamydomonas* genome project: a decade on." Trends in Plant Science **19**(10): 672-680.
- Blaby-Haas, C. E., M. D. Page et S. S. Merchant (2018). Using YFP as a Reporter of Gene Expression in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Reporter Gene Assays: Methods and Protocols. R. Damoiseaux and S. Hasson. New York, NY, Springer New York: 135-148.
- Borisjuk, N. V., L. G. Borisjuk, S. Logendra, F. Petersen, Y. Gleba et I. Raskin (1999). "Production of recombinant proteins in plant root exudates." Nat Biotech **17**(5): 466-469.
- Brooks, S. A. (2006). "Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins." Expert Review of Proteomics **3**(3): 345-359.
- Brown, R. (1966). On the organs and mode of fecundation of *Orchidex* and *Asclepiadea*. Miscellaneous Botanical Works. R. Society. London. **1**: 511–514.
- Cameron, D. E., C. J. Bashor et J. J. Collins (2014). "A brief history of synthetic biology." Nat Rev Micro **12**(5): 381-390.
- Cao, M., Y. Fu, Y. Guo et J. Pan (2009). "*Chlamydomonas* (Chlorophyceae) colony PCR." Protoplasma **235**(1): 107-110.
- Cerutti, H., A. M. Johnson, N. W. Gillham et J. E. Boynton (1997). "Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*." The Plant Cell **9**(6): 925-945.
- Cerutti, H., A. M. Johnson, N. W. Gillham et J. E. Boynton (1997). "A Eubacterial Gene Conferring Spectinomycin Resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration Into the Nuclear Genome and Gene Expression." Genetics **145**(1): 97.

- Cerutti, H., X. Ma, J. Msanne et T. Repas (2011). "RNA-Mediated Silencing in Algae: Biological Roles and Tools for Analysis of Gene Function." Eukaryotic Cell **10**(9): 1164-1172.
- Chae, L., T. Kim, R. Nilo-Poyanco et S. Y. Rhee (2014). "Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants." Science **344**(6183): 510.
- Cock, J. M., L. Sterck, P. Rouzé, D. Scornet, A. E. Allen, G. Amoutzias, V. Anthouard, F. Artiguenave, J.-M. Aury, J. H. Badger, B. Beszteri, K. Billiau, E. Bonnet, J. H. Bothwell, C. Bowler, C. Boyen, C. Brownlee, C. J. Carrano, B. Charrier, G. Y. Cho, S. M. Coelho, J. Collén, E. Corre, C. Da Silva, L. Delage, N. Delaroque, S. M. Dittami, S. Doulbeau, M. Elias, G. Farnham, C. M. M. Gachon, B. Gschloessl, S. Heesch, K. Jabbari, C. Jubin, H. Kawai, K. Kimura, B. Kloareg, F. C. Küpper, D. Lang, A. Le Bail, C. Leblanc, P. Lerouge, M. Lohr, P. J. Lopez, C. Martens, F. Maumus, G. Michel, D. Miranda-Saavedra, J. Morales, H. Moreau, T. Motomura, C. Nagasato, C. A. Napoli, D. R. Nelson, P. Nyvall-Collén, A. F. Peters, C. Pommier, P. Potin, J. Poulain, H. Quesneville, B. Read, S. A. Rensing, A. Ritter, S. Rousvoal, M. Samanta, G. Samson, D. C. Schroeder, B. Ségurens, M. Strittmatter, T. Tonon, J. W. Tregear, K. Valentin, P. von Dassow, T. Yamagishi, Y. Van de Peer and P. Wincker (2010). "The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae." Nature **465**: 617.
- Connolly, M. P. (2014). "Introduction of Yeast Genes into the Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, to Promote Algal Flocculation." Honors Theses(Paper 41).
- Dahm, R. (2005). "Friedrich Miescher and the discovery of DNA." Developmental Biology **278**(2): 274-288.
- Curran, K. A. et H. S. Alper (2012). "Expanding the chemical palate of cells by combining systems biology and metabolic engineering." Metabolic Engineering **14**(4): 289-297.
- Davies, D. R. (1971). "Single Cell Protein and the Exploitation of Mutant Algae lacking Cell Walls." Nature **233**: 143.
- Davies, J. P., D. P. Weeks et A. R. Grossman (1992). "Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*." Nucleic Acids Research **20**(12): 2959-2965.
- de Felipe, P., G. A. Luke, J. D. Brown et M. D. Ryan (2010). "Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences." Biotechnology Journal **5**(2): 213-223.

- Debuchy, R., S. Purton et J. D. Rochaix (1989). "The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus." The EMBO Journal **8**(10): 2803-2809.
- Delgoda, R. et J. E. Murray (2017). Chapter 7 - Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. Pharmacognosy. S. Badal and R. Delgoda. Boston, Academic Press: 93-100.
- Diamond, A. et I. Desgagné-Penix (2016). "Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids." Plant Biotechnology Journal **14**(6): 1319-1328.
- Díaz-Santos, E., M. Vega, M. Vila, J. Vígara et R. León (2013). "Efficiency of different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." Biotechnology Progress **29**(2): 319-328.
- Ding, M.-z., H.-f. Yan, L.-f. Li, F. Zhai, L.-q. Shang, Z. Yin et Y.-j. Yuan (2014). "Biosynthesis of Taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae* : Selection of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Directed by a Computer-Aided Docking Strategy." PLOS ONE **9**(10): e109348.
- Donnelly, M. L. L., L. E. Hughes, G. Luke, H. Mendoza, E. ten Dam, D. Gani et M. D. Ryan (2001). "The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences." Journal of General Virology **82**(5): 1027-1041.
- Doron, L., N. a. Segal et M. Shapira (2016). "Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications." Frontiers in Plant Science **7**(505).
- Du, J., Z. Shao et H. Zhao (2011). "Engineering microbial factories for synthesis of value-added products." Journal of industrial microbiology & biotechnology **38**(8): 873-890.
- Eichler-Stahlberg, A., W. Weisheit, O. Ruecker et M. Heitzer (2009). "Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*." Planta **229**(4): 873-883.
- Escoffre, J.-M., T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. Dean et M.-P. Rols (2009). "What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues." Molecular Biotechnology **41**(3): 286-295.

- Fang, C., Q. Wang, J. N. Selvaraj, Y. Zhou, L. Ma, G. Zhang et Y. Ma (2017). "High copy and stable expression of the xylanase XynHB in *Saccharomyces cerevisiae* by rDNA-mediated integration." Scientific Reports **7**: 8747.
- Ferrer-Miralles, N., J. Domingo-Espín, J. L. Corchero, E. Vázquez et A. Villaverde (2009). "Microbial factories for recombinant pharmaceuticals." Microbial Cell Factories **8**: 17-17.
- Ferris, P. J. (1995). "Localization of the Nic-7, Ac-29 and THI-10 Genes within the Mating-Type Locus of *Chlamydomonas Reinhardtii*." Genetics **141**(2): 543-549.
- Fischer, N. et J.-D. Rochaix (2001). "The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Molecular Genetic and Genomics **265**(5): 888-894.
- Fischer, N., O. Stampacchia, K. Redding et J. D. Rochaix (1996). "Selectable marker recycling in the chloroplast." Molecular and General Genetics MGG **251**(3): 373-380.
- Friso, G. et K. J. van Wijk (2015). "Posttranslational Protein Modifications in Plant Metabolism." Plant Physiology **169**(3): 1469.
- Fuhrmann, M., A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schödl, M. Heitzer et P. Hegemann (2004). "Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene." Plant Molecular Biology **55**(6): 869-881.
- Fuhrmann, M., W. Oertel et P. Hegemann (1999). "A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*." The Plant Journal **19**(3): 353-361.
- Garcia-Echauri, S. A. et G. A. Cardineau (2015). "TETX: a novel nuclear selection marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation." Plant Methods **11**(1): 1-7.
- Georgianna, D. R. et S. P. Mayfield (2012). "Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels." Nature **488**(7411): 329-335.
- Gibson, D. G., L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison Iii et H. O. Smith (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." Nature Methods **6**: 343.

- Gimpel, J. A., V. Henríquez et S. P. Mayfield (2015). "In Metabolic Engineering of Eukaryotic Microalgae: Potential and Challenges Come with Great Diversity." Frontiers in Microbiology **6**(1376).
- Granek, J. A. et P. M. Magwene (2010). "Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast." PLoS Genetics **6**(1): e1000823.
- Grigliatti, T. et R. Mottus (2001). Position Effects. Encyclopedia of Genetics. S. Brenner and J. H. Miller. New York, Academic Press: 1523-1530.
- Hall, L. M., K. B. Taylor et D. D. Jones (1993). "Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*." Gene **124**(1): 75-81.
- Harris, E. H. (2001). "Chlamydomonas as a model organism." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**(1): 363-406.
- Harris, E. H., D. B. Stern et G. B. Witman (2009). Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition). London, Academic Press. **1**.
- Hawkins, K. M. et C. D. Smolke (2008). "Production of benzylisoquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature Chemical Biology **4**: 564.
- Heinig, U., M. Gutensohn, N. Dudareva et A. Aharoni (2013). "The challenges of cellular compartmentalization in plant metabolic engineering." Current Opinion in Biotechnology **24**(2): 239-246.
- Heitzer, M., A. Eckert, M. Fuhrmann et C. Griesbeck (2007). Influence of Codon Bias on the Expression of Foreign Genes in Microalgae. Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. R. León, A. Galván and E. Fernández. New York, NY, Springer New York: 46-53.
- J., B. A., K. Daniel et W. D. P. (2014). "Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production." Plant Biotechnology Journal **12**(7): 894-902.
- Jackson, D. A., R. H. Symons et P. Berg (1972). "Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **69**(10): 2904.

- Jackson, Matthew P. et Eric W. Hewitt (2016). "Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes." Essays in Biochemistry **60**(2): 173-180.
- Jacob, F. et J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." Journal of Molecular Biology **3**(3): 318-356.
- Jenkins, N. (2007). "Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects." Cytotechnology **53**(1): 121-125.
- Jeon, K., A. Suresh et Y.-C. Kim (2013). "Highly efficient molecular delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation." Korean Journal of Chemical Engineering **30**(8): 1626-1630.
- Jinkerson, R. E. et M. C. Jonikas (2015). "Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome." The Plant Journal **82**(3): 393-412.
- Kajikawa, M., S. Kinohira, A. Ando, M. Shimoyama, M. Kato et H. Fukuzawa (2015). "Accumulation of Squalene in a Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by Genetic Modification of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase Genes." PLOS ONE **10**(3): e0120446.
- Kasai, Y. et S. Harayama (2016). "Construction of Marker-Free Transgenic Strains of *Chlamydomonas reinhardtii* Using a Cre/loxP-Mediated Recombinase System." PLoS ONE **11**(8): e0161733.
- Kindle, K. L. (1990). "High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(3): 1228-1232.
- Kindle, K. L. (1998). Nuclear Transformation: Technology and Applications. The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*. J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant. Dordrecht, Springer Netherlands: 41-61.
- Kindle, K. L., R. A. Schnell, E. Fernández et P. A. Lefebvre (1989). "Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase." The Journal of Cell Biology **109**(6): 2589-2601.
- Kitayama, M. et R. K. Togasaki (1995). "Purification and cDNA Isolation of Chloroplastic Phosphoglycerate Kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiology **107**(2): 393-393.
- Komarnytsky, S., N. V. Borisjuk, L. G. Borisjuk, M. Z. Alam et I. Raskin (2000). "Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid." Plant Physiology **124**(3): 927-934.

- Kong, F., T. Yamasaki, S. D. Kurniasih, L. Hou, X. Li, N. Ivanova, S. Okada et T. Ohama (2015). "Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains." Journal of Bioscience and Bioengineering **120**(3): 239-245.
- Kroymann, J. (2011). "Natural diversity et adaptation in plant secondary metabolism." Current Opinion in Plant Biology **14**(3): 246-251.
- Kumar, A., V. R. Falcao et R. T. Sayre (2013). "Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*." Algal Research **2**(4): 321-332.
- Kumar, S. V., R. W. Misquitta, V. S. Reddy, B. J. Rao et M. V. Rajam (2004). "Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*." Plant Science **166**(3): 731-738.
- L., K. J., Z. Jun, F. R. P. et W. D. P. (2002). "Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation." The Plant Journal **29**(1): 109-117.
- Labadorf, A., A. Link, M. F. Rogers, J. Thomas, A. S. N. Reddy et A. Ben-Hur (2010). "Genome-wide analysis of alternative splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*." BMC Genomics **11**: 114-114.
- Lauersen, K. J., H. Berger, J. H. Mussnug et O. Kruse (2013). "Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*." Journal of Biotechnology **167**(2): 101-110.
- Lauersen, K. J., O. Kruse et J. H. Mussnug (2015). "Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(8): 3491-3503.
- León-Bañares, R., D. González-Ballester, A. Galván et E. Fernández (2004). "Transgenic microalgae as green cell-factories." Trends in Biotechnology **22**(1): 45-52.
- Lewis, D. M. (2011). 9 - The chemistry of reactive dyes and their application processes. Handbook of Textile and Industrial Dyeing. M. Clark, Woodhead Publishing. **1**: 303-364.
- Liang, M.-H., J. Zhu et J.-G. Jiang (2018). "High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress." Critical Reviews in Food Science and Nutrition: 01-53.

- Lim, C. G., Z. L. Fowler, T. Hueller, S. Schaffer et M. A. G. Koffas (2011). "High-Yield Resveratrol Production in Engineered Escherichia coli." Applied and Environmental Microbiology **77**(10): 3451-3460.
- Lim, J.-M. (2013). "Development of cyan fluorescent protein (CFP) reporter system in green alga Chlamydomonas reinhardtii and macroalgae Pyropia sp." Plant biotechnology reports v. **7**(no. 3): pp. 407-414-2013 v.2017 no.2013.
- Liu, X., W. Ding et H. Jiang (2017). "Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production." Microbial Cell Factories **16**(1): 125.
- Lodha, M. et M. Schroda (2005). "Analysis of Chromatin Structure in the Control Regions of the Chlamydomonas HSP70A and RBCS2 Genes." Plant Molecular Biology **59**(3): 501-513.
- Lodha, M., M. Schulz-Raffelt et M. Schroda (2008). "A New Assay for Promoter Analysis in Chlamydomonas Reveals Roles for Heat Shock Elements and the TATA Box in HSP70A Promoter-Mediated Activation of Transgene Expression." Eukaryotic Cell **7**(1): 172-176.
- Lumbreras, V., R. Stevens David et S. Purton (1998). "Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron." The Plant Journal **14**(4): 441-447.
- M. L. T. M. Polizeli, A. C. S. R. M. F. T. A. J. S. A. (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." Applied Microbiology and Biotechnology **67**(5): pp 577-591.
- Mathieu-Rivet, E., M. Scholz, C. Arias, F. Dardelle, S. Schulze, F. Le Mauff, G. Teo, A. K. Hochmal, A. Blanco-Rivero, C. Loutelier-Bourhis, M.-C. Kiefer-Meyer, C. Fufezan, C. Burel, P. Lerouge, F. Martinez, M. Bardor et M. Hippler (2013). "Exploring the N-glycosylation Pathway in Chlamydomonas reinhardtii Unravels Novel Complex Structures." Molecular & Cellular Proteomics : MCP **12**(11): 3160-3183.
- Mayfield, S. P. et K. L. Kindle (1990). "Stable nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii by using a C. reinhardtii gene as the selectable marker." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(6): 2087-2091.
- Meddeb-Mouelhi, F., J. K. Moisan et M. Beauregard (2014). "A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity." Enzyme and Microbial Technology **66**: 16-19.

- Mendel, G. (1866). "Versuche über Pflanzenhybriden." Verh. Nat.forsch Ver. Brünn(4): 3-47.
- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W. F. Marshall, L.-H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.-L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.-P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.-J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W. C. A. Ngau, B. Otiillar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar et A. R. Grossman (2007). "The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions." Science **318**(5848): 245.
- Meslet-Cladière, L. et O. Vallon (2011). "Novel Shuttle Markers for Nuclear Transformation of the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii." Eukaryotic Cell **10**(12): 1670-1678.
- Messerli, M. A., L. A. Amaral-Zettler, E. Zettler, S.-K. Jung, P. J. S. Smith et M. L. Sogin (2005). "Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile." Journal of Experimental Biology **208**(13): 2569.
- Minskaia, E., J. Nicholson et M. D. Ryan (2013). "Optimisation of the foot-and-mouth disease virus 2A co-expression system for biomedical applications." BMC Biotechnology **13**(1): 67.
- Mobin, S. et F. Alam (2017). "Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review." Energy Procedia **110**: 510-517.
- Molino, J. V. D., J. C. M. de Carvalho et S. P. Mayfield (2018). "Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: Expanding the secretion portfolio for Chlamydomonas reinhardtii." PLOS ONE **13**(2): e0192433.

- Mussnug, J. H. (2015). "Genetic tools et techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(13): 5407-5418.
- Nakagawa, A., H. Minami, J.-S. Kim, T. Koyanagi, T. Katayama, F. Sato et H. Kumagai (2011). "A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids." Nature Communications **2**: 326.
- Nelson, J. A., P. B. Savereide et P. A. Lefebvre (1994). "The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation." Molecular and Cellular Biology **14**(6): 4011-4019.
- Neupert, J., D. Karcher et R. Bock (2009). "Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes." The Plant Journal **57**(6): 1140-1150.
- Norton, T. A., M. Melkonian et R. A. Andersen (1996). "Algal biodiversity." Phycologia **35**(4): 308-326.
- O'Neill, E. C. et S. Kelly (2016). "Engineering biosynthesis of high-value compounds in photosynthetic organisms." Critical Reviews in Biotechnology: 1-24.
- Onishi, M. et J. R. Pringle (2016). "Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*." G3: Genes|Genomes|Genetics **6**(12): 4115-4125.
- Pallier, C. (2001). "Les régions non traduites des ARN messagers et leur rôle dans la synthèse protéique." médecine/sciences **17**(1): 23 - 32.
- Plucinak, T. M., K. M. Horken, W. Jiang, J. Fostvedt, S. T. Nguyen et D. P. Weeks (2015). "Improved and versatile viral 2A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii*." The Plant Journal **82**(4): 717-729.
- Pratheesh, P. T., M. Vineetha et G. M. Kurup (2014). "An Efficient Protocol for the Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." Molecular Biotechnology **56**(6): 507-515.
- Ramos-Martinez, E. M., L. Fimognari et Y. Sakuragi (2017). "High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Biotechnology Journal **15**(9): 1214-1224.
- Rasala, B. A., D. J. Barrera, J. Ng, T. M. Plucinak, J. N. Rosenberg, D. P. Weeks, G. A. Oyler, T. C. Peterson, F. Haerizadeh and S. P. Mayfield (2013). "Expanding the

spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." The Plant Journal **74**(4): 545-556.

- Rasala, B. A., S.-S. Chao, M. Pier, D. J. Barrera et S. P. Mayfield (2014). "Enhanced Genetic Tools for Engineering Multigene Traits into Green Algae." PLoS ONE **9**(4): e94028.
- Rasala, B. A., P. A. Lee, Z. Shen, S. P. Briggs, M. Mendez et S. P. Mayfield (2012). "Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide." PLoS ONE **7**(8): e43349.
- Raymond James, A., G. Janech Michael et H. Fritsen Christian (2009). "Novel ICE-Binding proteins from a psychrophilic antarctic alga (*Chlamydomonadaceae*, *Chlorophyceae*)." Journal of Phycology **45**(1): 130-136.
- Reetz, M. T. (2016). Selection versus Screening in Directed Evolution. Directed Evolution of Selective Enzymes. W. o. library.
- Rosales-Mendoza, S., L. M. T. Paz-Maldonado et R. E. Soria-Guerra (2012). "*Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives." Plant Cell Reports **31**(3): 479-494.
- Ruecker, O., K. Zillner, R. Groebner-Ferreira et M. Heitzer (2008). "Gussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Molecular Genetics and Genomics **280**(2): 153-162.
- Ryan, M. D. et J. Drew (1994). "Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein." The EMBO Journal **13**(4): 928-933.
- Ryan, M. D., A. M. Q. King et G. P. Thomas (1991). "Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence." Journal of General Virology **72**(11): 2727-2732.
- Scaife, M. A., G. T. D. T. Nguyen, J. Rico, D. Lambert, K. E. Helliwell et A. G. Smith (2015). "Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host." The Plant Journal **82**(3): 532-546.
- Schroda, M. (2006). "RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools." Current Genetics **49**(2): 69-84.

- Schroda, M., F. Beck Christoph et O. Vallon (2002). "Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*." The Plant Journal **31**(4): 445-455.
- Schroda, M., D. Blöcker et C. F. Beck (2000). "The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*." The Plant Journal **21**(2): 121-131.
- Scranton, M. A., J. T. Ostret, D. R. Georgianna, S. M. Lofgren, D. Li, R. C. Ellis, D. N. Carruthers, A. Dräger, D. L. Masica and S. P. Mayfield (2016). "Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Algal Research **15**: 135-142.
- Shao, N. et R. Bock (2008). "A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Current Genetics **53**(6): 381-388.
- Shimogawara, K., S. Fujiwara, A. Grossman et H. Usuda (1998). "High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation." Genetics **148**(4): 1821-1828.
- Sizova, I., M. Fuhrmann et P. Hegemann (2001). "A *Streptomyces rimosus*aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*." Gene **277**(1): 221-229.
- Slattery, S. S., A. Diamond, H. Wang, J. A. Therrien, J. T. Lant, T. Jazey, K. Lee, Z. Klassen, I. Desgagné-Penix, B. J. Karas et D. R. Edgell (2018). "An Expanded Plasmid-Based Genetic Toolbox Enables Cas9 Genome Editing and Stable Maintenance of Synthetic Pathways in *Phaeodactylum tricornutum*." ACS Synthetic Biology **7**(2): 328-338.
- Soboleski, M. R., J. Oaks et W. P. Halford (2005). "Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **19**(3): 440-442.
- Specht, E. A., H. H. Nour-Eldin, K. T. D. Hoang et S. P. Mayfield (2015). "An improved ARS2-derived nuclear reporter enhances the efficiency and ease of genetic engineering in *Chlamydomonas*." Biotechnology Journal **10**(3): 473-479.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran et A. Isambert (2006). "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and Bioengineering **101**(2): 87-96.

- Stevens, D. R., S. Purton et J. D. Rochaix (1996). "The bacterial phleomycin resistance gene as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*." Molecular and General Genetics MGG **251**(1): 23-30.
- Strenkert, D., S. Schmollinger et M. Schroda (2013). "Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*." Nucleic Acids Research.
- Szymczak-Workman, A. L., K. M. Vignali et D. A. A. Vignali (2012). "Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors." Cold Spring Harbor Protocols **2012**(2): pdb.ip067876.
- Technologies, L. (2013). GeneArt® *Chlamydomonas* Engineering Kits. Invitrogen. California, Invitrogen.
- Technologies, L. (2016). GeneArt® *Chlamydomonas* Protein Expression Vector. Invitrogen. California, Invitrogen.
- Torronen, A., R. L. Mach, R. Messner, R. Gonzalez, N. Kalkkinen, A. Harkki et C. P. Kubicek (1992). "The Two Major Xylanases from *Trichoderma reesei*: Characterization of Both Enzymes and Genes." Nat Biotech **10**(11): 1461-1465.
- Torronen, A. et J. Rouvinen (1995). "Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*." Biochemistry **34**(3): 847-856.
- Trenchard, I. J. et C. D. Smolke (2015). "Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast." Metabolic engineering **30**: 96-104.
- Usmani, S. S., G. Bedi, J. S. Samuel, S. Singh, S. Kalra, P. Kumar, A. A. Ahuja, M. Sharma, A. Gautam et G. P. S. Raghava (2017). "THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics." PLoS ONE **12**(7): e0181748.
- Vítová, M., K. Bišová, M. Hlavová, S. Kawano, V. Zachleder et M. Čížková (2011). "*Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by temperature." Planta **234**(3): 599-608.
- Walia, A., S. Guleria, P. Mehta, A. Chauhan et J. Parkash (2017). "Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review." Biotech **7**(1): 11.
- Walsh, G. et R. Jefferis (2006). "Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins." Nature Biotechnology **24**: 1241.

- Watson, J. D. et F. H. C. Crick (1953). "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." Nature **171**: 737.
- Wecker, M. S. A., J. E. Meuser, M. C. Posewitz et M. L. Ghirardi (2011). "Design of a new biosensor for algal H₂ production based on the H₂-sensing system of *Rhodobacter capsulatus*." International Journal of Hydrogen Energy **36**(17): 11229-11237.
- Weiner, I., S. Atar, S. Schweitzer, H. Eilenberg, Y. Feldman, M. Avitan, M. Blau, A. Danon, T. Tuller et I. Yacoby (2018). "Enhancing heterologous expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by transcript sequence optimization." The Plant Journal **94**(1): 22-31.
- Wink, M. (2010). Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. Annual plant reviews. M. Wink, A John Wiley & Sons, Ltd. **40**: 1-19.
- Wurtzel, E. T. et T. M. Kutchan (2016). "Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future." Science **353**(6305): 1232-1236.
- Xu, P., N. Bhan et M. A. G. Koffas (2013). "Engineering plant metabolism into microbes: from systems biology to synthetic biology." Current Opinion in Biotechnology **24**(2): 291-299.
- Yamano, T., H. Iguchi et H. Fukuzawa (2013). "Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal." Journal of Bioscience and Bioengineering **115**(6): 691-694.
- Yang, S., C. J. Cohen, P. D. Peng, Y. Zhao, L. Cassard, Z. Yu, Z. Zheng, S. Jones, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg et R. A. Morgan (2008). "Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition." Gene therapy **15**(21): 1411-1423.
- Yoon, H. S., J. D. Hackett, C. Ciniglia, G. Pinto et D. Bhattacharya (2004). "A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes." Molecular Biology and Evolution **21**(5): 809-818.
- Yoon, J. H., J. E. Park, D. Y. Suh, S. B. Hong, S. J. Ko et S. H. Kim (2007). "Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi." Mycobiology **35**(1): 21-24.
- Zhang, X., M. Li, A. Agrawal et K.-Y. San (2011). "Efficient free fatty acid production in *Escherichia coli* using plant acyl-ACP thioesterases." Metabolic Engineering **13**(6): 713-722.