

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

APPROCHE D'INGÉNIERIE MÉTABOLIQUE DE LA MICROALGUE VERTE
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII POUR LA BIOSYNTHÈSE PARTIELLE DES
CANNABINOÏDES DE FAÇON HÉTÉROLOGUE

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR

SERGE BASILE NOUEMSSI

Mai 2025

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

Direction de recherche :

Isabel Desgagné-Penix

Directrice de recherche

Hugo Germain

Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation de la thèse :

Isabel Desgagné-Penix

Directrice de recherche

Hugo Germain

Codirecteur de recherche

Carlos Reyes-Moreno

Président de jury

Narimane Mati-Baouche

Évaluatrice externe

Patrice Hamel

Évaluateur externe

Thèse soutenue le 15 avril 2025

*« L'optimisme est la foi qui mène au
succès. Rien ne peut être fait sans
espoir et confiance. »*

Helen Keller

DÉDICACE

À

Ma mère Monbou Rebecca,

Ma fille Keziah Nouemssi

Et

La mémoire de ma grand-mère Yomgni Martine

Remerciements

L'occasion m'étant offert de remercier tous ceux qui ont contribué et impacté de près ou de loin à la conception, la réalisation, l'amélioration et au bon déroulement de ce projet de thèse, je tiens à remercier Dieu tout puissant pour le souffle de vie, la force et le courage qu'il me donne au quotidien pour mener à bien les tâches qui me sont confiées.

Un merci du fond du cœur à une personne exceptionnelle qui à travers de petit gestes accompli des merveilles dans la vie du monde autour d'elle. Il s'agit bel et bien de ma directrice de recherche, la professeure Isabel Desgagné-Penix, à qui je souhaite présenter toute ma gratitude. Professeure, vous avez toujours su trouver les mots justes pour nous encourager à aller de l'avant dans nos projets respectifs tout en aiguisant notre esprit scientifique et ayant foi en nous. Plus qu'une directrice de thèse, vous êtes un modèle d'excellence scientifique, une source d'inspiration intarissable, car quel que soit le défi, vous trouvez toujours une porte de sortie. Vous avez été présente durant ces six dernières années comme une employeuse, une collègue et comme un parent. Car malgré nos divergences culturelles, vous avez réussi à créer une famille scientifique inclusive dans laquelle tout le monde se sent chez soi, trouve du réconfort au besoin, et ce, malgré les milliers de kilomètre de distance qui nous sépare de nos proches respectifs. Merci pour toute la confiance, la liberté d'entreprendre que vous m'avez accordé pendant toutes ces années.

Je souhaite également remercier mon co-directeur, le professeur Hugo Germain qui œuvre au quotidien à ce que nous soyons non seulement de bon scientifique ayant un esprit critique développé, et une vision poussée du monde de la recherches, mais également des personnes avec des valeurs humaines et morales de qualité. Merci pour cet environnement de travail paisible et épanoui que vous avez réussi à bâtir autour de vous, et au laboratoire, qui nous motive à chaque semaine d'y retourner et de travailler en toute liberté.

À tous les membres du jury d'évaluation, Prof. Carlos Reyes-Moreno, Prof. Patrice Hamel et Prof. Narimane Mati-Baouche, je vous adresse mes profonds remerciements pour avoir accepté de contribuer à l'amélioration de ce travail à travers vos remarques et commentaires qui sans aucun doute me permettront de bonifier la qualité de cette thèse.

Merci à la professeure Céline Van Themsche, directrice du programme de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'UQTR et à tout le personnel administratif du programme pour vos services et soutiens académiques.

J'adresse mes remerciements à tous les professeur(e)s du département de Biochimie Chimie Physique et Science forensique et du pavillon Pierre Bouché en particulier Prof. Tagnon Missihoun pour les enseignements, les échanges scientifiques et la mise à disposition des appareils et instruments qui m'ont permis de réaliser une partie de mes travaux de recherche.

Je remercie toutes les assistantes de recherches du laboratoire IDP, Fatma Meddeb, Natacha Mérindol et Sarah-Ève Gelinat pour l'encadrement exceptionnel et surtout les discussions scientifiques constructives qui m'ont aidé à améliorer mes qualités de chercheur, que ce soit sur le plan expérimentale ou de rédaction de document scientifique. Vous êtes les meilleures! À Mélodie B. Plourde assistante de recherche du laboratoire HG, je te remercie grandement pour toute ta bienveillance et le travail exceptionnel que tu accomplis au quotidien qui nous permet de travailler dans de meilleure condition.

Un merci particulier à Rémy Beauchemin, Dr. Saifur Rahman, Dr. Seydou Ka, Dr. Andrew Diamond, Dre. Manel Ghribi et Dre. Fatima Awwad pour l'accueil et les efforts consentis à mon intégration dans l'équipe et toutes les collaborations fructueuses que nous avons pu établir durant ce séjour.

J'exprime ma gratitude à tous les post-doc du laboratoire passé et présent Bharat Bhusan Majhi, Daris, Yaouba, Elisa Fantino, Thilina, Karen, et Arun. Travailler auprès de vous a été une belle opportunité d'apprentissage pour moi.

Merci à tous mes collègues de laboratoire pour cette magnifique famille scientifique que nous avons formé, en particulier, Ayoub Bouhadada, Alexandre Custeau, Nicolas Sene, Pamela Lavoie, Claire Letanneur, Théo Devèze, Anis Messaabi, Snehi Gazal, Vahid Karimzadegan, Narimane Fradj, Teura Barff, Manoj Koirala, Maribel Diaz-Garza, Ingrid, Zainab, Fadoua, Nikunj Sharma, Basanta, William, Arghavan et Sameera.

Merci aux collègues des autres laboratoires et du laboratoire d'enseignement pour le bon temps et les moments inoubliables qui nous avons partagé. Il s'agit de : Vicky Beaupré, George Fangué, Lloyd Fotso, Ghada Elfayres, Alexandre Clouet, Priya, et Karima.

En outre, je tiens à remercier tous les membres de ma famille frères et sœurs pour leur amour inébranlable, leur soutien inconditionné et encouragement. Vous qui avez tant contribué à mon éducation et avez toujours été présent dans les bons et les mauvais moments, je vous suis reconnaissant pour tout et je ne vous remercierai jamais assez.

Merci à ma belle-famille en particulier ma belle-sœur Fanie Ndoutou pour son soutien moral et les multiples motivations qui m'ont aidé à toujours garder la tête haute malgré les défis.

Il y a des frères dont on hérite et ceux dont on se crée. Romaric Mouafo tu es sans doute un frère d'une autre mère car à travers des gestes et les actes que tu poses, tu m'as prouvé plusieurs fois que je pouvais compter sur toi. Bien que des milliers de kilomètre nous sépare et en plus de tes responsabilités familiales, tu continues à te soucier pour mon bien être et je te remercie du fond du cœur pour cette grande considération et le respect que tu as à mon égard.

Abdoulaye Ouedraogo quel aventure! Ça va bientôt faire 6 ans qu'on a fait connaissance dans le parking de l'UQTR, toi venant du Burkina Faso et moi du Cameroun. Aventuré dans un monde dont on ne connaissait personne et malgré la divergence de culture, nous avons pu se serrer les coudes et avancé comme de vaillant combattant au front, et aujourd'hui je ne peux être que fière des hommes et papa de familles que nous sommes devenu. Merci pour tout et surtout pour cette amitié inébranlable, merci à ton épouse Oumou Derra pour les calories et la bienveillance, à ta fille chérie Alia Ouedraogo pour le bonheur et le sourire qui adouci nos cœurs.

Kah Rogers, toi qui m'as appris l'auto-motivation et la résilience dans tous les domaines, partager la collocation avec toi pendant toute mes études de maîtrise et plus à l'université de Yaoundé I est sans doute un des moments qui ont marqué ma vie et je suis très chanceux de t'avoir comme ami et frère. Merci d'être toujours présent pour moi.

Un merci particulier à Diane Lacroix. Bien que tu sois la mère de mon co-directeur, tu m'as à plusieurs reprises démontré qu'un amour maternel est un amour sans frontière. Tu nous as accueilli comme amis, fils et petit-fils, mon épouse, ma fille et moi. Tu as fortement contribué à l'intégration de Claudine et à son soutien après la naissance de Keziah à travers divers cadeaux et repas que nous avons partagé ensemble.

J'aimerais adresser un merci à mes amis qui m'ont supporté et soutenu depuis le secondaire jusqu'à présent. Egougo, Deyris, Marthe, Franck et Éric.

Merci à Anne-Sophie pour les délicieux fondant au chocolat et surtout pour son amitié et les échanges constructifs et les beaux temps qu'on a eu à partager au cours de ces cinq dernières années.

Le meilleur étant pour la fin, je tiens à témoigner ma gratitude à une femme forte pleine de caractère et d'amour qui a toujours su trouver les mots juste pour me rassurer, et qui m'aime d'un amour inconditionné. Il s'agit de mon épouse Claudine Ndoli Ndoutou, à qui je dis merci pour tout le bonheur qu'elle apporte dans ma vie et ses efforts quotidiens pour veiller au bien être de notre petite famille. Merci d'avoir fait de moi le papa le plus heureux du monde mon amour.

Résumé

Plus d'une centaine de cannabinoïdes (CBs) ont été rapportés à ce jour, incluant le psychoactif Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) et l'immunomodulateur cannabidiol (CBD). Comme le THC et le CBD, plusieurs autres CBs possèdent diverses propriétés bioactives qui les rendent prisés dans le secteur agro-alimentaire, pharmaceutique et médicinal. Au cours des dernières années, la demande de produits à base de cannabis et de CBs a augmenté en raison de leur légalisation croissante à des fins médicales et récréatives dans le monde entier. De ce fait, le marché du cannabis a connu une évolution significative et est estimé à 33,84 milliards USD en 2024, et pourrait atteindre la barre de 69,25 milliards USD d'ici 2029, avec environ un tiers du bénéfice total généré par la vente des CBs pharmaceutiques. Cependant, ces CBs d'intérêt pharmaceutique sont principalement extraits et purifiés de la plante de cannabis. Ce qui pose des défis en raison de la variabilité du rendement et de la pureté, car comme la majorité des composés naturels, les CBs, particulièrement les mineurs, sont difficiles à extraire en grande quantités à partir de la plante ou à synthétiser chimiquement. À cet effet, l'approche biotechnologique d'ingénierie métabolique des microorganismes a été proposée. Elle consiste à reconstruire la voie métabolique de biosynthèse des CBs dans les microorganismes hôtes pour la production *de novo* de la molécule cible. À date, la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* n'a pas encore été investiguée à cette fin.

C. reinhardtii est un microorganisme unicellulaire eucaryote photosynthétique diversifié, qui de nos jours, intéresse de façon exponentielle la recherche appliquée. Ses génomes (nucléaire, chloroplastique et mitochondriale) sont complètement séquencés, elle est autotrophe avec un cycle de vie sexué et asexué. De reproduction rapide, sa culture est facile et peu coûteuse. Grâce au développement de plusieurs outils et de techniques moléculaires de pointe permettant de manipuler ses génomes, ce microorganisme a été utilisé pour la production de divers métabolites, incluant ceux de la voie des isoprénoïdes impliqués dans la synthèse naturelle des CBs chez *C. sativa*. Ayant la capacité d'intégrer et d'exprimer des gènes exogènes dans ses génomes nucléaire ou chloroplastique, *C. reinhardtii* peut servir de plateforme alternative durable et prometteuse pour la production hétérologue des CBs.

Dans cette thèse, notre principal objectif était de transformer le génome nucléaire de la microalgue verte avec les gènes impliqués dans la voie métabolique de biosynthèse des CBs, et de caractériser les transformants générés pour leur capacité à intégrer, à exprimer et à produire les CBs cibles.

Spécifiquement, nous avons intégré aléatoirement par la méthode d'électroporation les gènes codant pour l'aromatique prényltransférase soluble (*NphB*, pour substituer celle de *C. sativa* qui est membranaire) et pour l'acide cannabidiolique synthase (*CBDAS*) dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, afin de tenter de produire le CBGA et le CBDA. L'intégration des transgènes se faisant de manière aléatoire dans le génome nucléaire de cette microalgue, le maintien, la sélection et l'identification des clones transformés capables d'exprimer les gènes d'intérêt est un processus long et complexe. De ce fait, le projet a été divisé en deux parties :

- 1- La première partie consiste à développer une méthode pouvant permettre de contourner le défi du processus de sélection et d'identification des transformants ayant intégré les transgènes. Pour ce faire, nous avons optimisé une méthode existante de criblage standard en une méthode de criblage à haut débit par PCR sur colonie des transformants générés. Cette méthode nous a non seulement permis de gagner en temps dans le processus de sélection, mais aussi d'augmenter la taille des échantillons à tester tout en assurant la fiabilité des résultats générés.
- 2- Dans la deuxième partie, nous avons exploité la méthode développée pour tester plusieurs stratégies d'expression des transgènes *NphB* et *CBDAS* dans la microalgue, et de caractériser les transformants pour la production des métabolites ciblés. Ces stratégies incluent la coexpression des deux gènes liés dans un seul cadre de lecture par un peptide auto clivable *FMDV2A* (*Foot and Mouth Disease Virus 2A*), la coexpression des gènes dans des cadres de lecture individuel, l'expression séparée des gènes, la variation des éléments de régulation de l'expression (promoteurs et terminateurs) et le test de la reproductibilité des résultats générés dans plusieurs souches de *C. reinhardtii*. Ainsi, nous avons pu générer à partir de trois souches de microalgues différentes, plusieurs transformants produisant la protéine active du gène *NphB*, qui a permis la synthèse du CBGA *in vitro*. En revanche, nous n'avons pas pu produire le CBDAS dans *C. reinhardtii*.

Les résultats obtenus dans cette thèse nous ont permis de rédiger deux articles de recherche, dont le premier a été publié dans la revue *MDPI Life* en 2020, et le second a été soumis en 2025 dans la revue *Microbial Cell Factories*.

Ces articles présentent et discutent les défis de l'expression de *NphB* et de *CBDAS* dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, tout en proposant les stratégies alternatives pouvant contribuer à améliorer la production des CBs ainsi que d'autres métabolites chez *C. reinhardtii*.

Mots clés :

Criblage à haut débit; microalgue; colonie-PCR; transformation nucléaire; *Chlamydomonas reinhardtii*; biologie synthétique; aromatique prényltransférase; acide Cannabidiolique synthase; *Escherichia coli*; Cannabinoïdes

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	II
REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	XVI
I. CHAPITRE 1	1
I. 1. INTRODUCTION	1
1. 1. Généralité sur les cannabinoïdes	1
1. 2. Historique de l'usage du cannabis et des cannabinoïdes et son statut légal	3
1. 3. Intérêt médical, pharmaceutique et économique du cannabis et des cannabinoïdes	4
1. 4. Contraintes liées à la production du cannabis et des cannabinoïdes.....	6
1. 5. Voies alternatives de production des cannabinoïdes.....	6
1. 6. Voie de biosynthèse des cannabinoïdes chez <i>Cannabis sativa</i>	7
1. 7. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes.....	9
1. 8. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes dans la bactérie <i>Escherichia coli</i>	9
1. 9. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes chez des hôtes eucaryotes.....	10
1. 10. La microalgue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
1. 11. Origine, taxonomie, cycle de vie et anatomie de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
1. 12. Potentialités de <i>C. reinhardtii</i> pour la production naturel et hétérologue des molécules d'intérêt	20
1. 13. Stratégies d'expression des transgènes dans <i>C. reinhardtii</i> et défis associés	20
I. 2. Hypothèses de recherche	23
I. 3. Objectifs du projet.....	24
II. CHAPITRE 2: RAPID AND EFFICIENT COLONY-PCR FOR HIGH THROUGHPUT SCREENING OF GENETICALLY TRANSFORMED CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	26

II. 1. Introduction	29
II. 2. Materials and Methods	31
2. 1. <i>C. reinhardtii</i> strain, plasmid and primers design.....	31
2. 2. <i>C. reinhardtii</i> growth and transformation conditions	32
2. 3. Strains layout and selection method	33
2. 4. High throughput genomic DNA extraction	34
2. 5. HT PCR and HT sample loading onto adapted agarose gel.....	35
II. 3. Results.....	36
3. 1. Strains layout and HTS DNA extraction	36
3. 2. High-throughput screening cPCR and revelation.....	38
II. 4. Discussion	39
II. 5. Conclusion.....	41
II. 6. References	42

III. CHAPITRE 3: HETEROLOGOUS EXPRESSION OF NPHB AND CBDAS IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* REVEALS KEY BARRIERS AND OPPORTUNITIES FOR CANNABINOID BIOSYNTHESIS IN MICROALGAE 47

III. 1. Introduction	50
III. 2. Materials and Methods	53
2. 1. Cultivation conditions of microalgal and bacterial strains	53
2. 2. PCR amplification, cloning, and expression vector constructions	54
2. 3. Transgene expression in the prokaryotic system, screening, and protein production.....	55
2. 4. Nuclear transformation and screening of the microalga <i>C. reinhardtii</i>	56
2. 5. DNA extraction and colony PCR in <i>C. reinhardtii</i>	57
2. 6. Total RNA extraction and quantitative PCR.....	58
2. 7. Total protein extraction and western blot analysis.....	59
2. 8. Enzymatic assays and CBGA detection	60
2. 9. Olivetolic acid supplementation and metabolite extraction.....	60
2. 10. Cannabinoids and precursors standards.....	61
III. 3. Results	63
3. 1. Production of NphB and CBDAS enzymes in <i>E. coli</i>	63
3. 2. Co-expression of <i>NphB</i> and <i>CBDAS</i> transgenes as a single ORF in the microalga <i>C. reinhardtii</i>	65
3. 3. Expression of NphB and CBDAS using independent ORFs	68
3. 4. PSAD-driven nuclear expression enables functional accumulation of NphB but not CBDAS in <i>C. reinhardtii</i>	69
3. 5. Assessment of <i>NphB</i> Expression in Multiple <i>C. reinhardtii</i> Strains	70
3. 6. <i>C. reinhardtii</i> -Expressed NphB Catalyzes CBGA Production <i>in vitro</i>	73
III. 4. Discussion.....	75
III. 5. References	80

IV. CHAPITRE 4: DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	89
IV. 1. Discussion.....	89
1. 1. Chapitre II - PCR de colonies rapide et efficace pour le criblage à haut débit de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> génétiquement transformé	89
1. 2. Chapitre III - Ingénierie métabolique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> comme châssis pour la production de cannabinoïdes.....	91
IV. 2. Conclusion.....	101
IV. 3. Perspectives.....	102
IV. 4. Références	104
ANNEXE A.....	125
ANNEXE B.....	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Pages
<u>Chapitre 2</u>	
Table 2. 1. Number of transgenes selected by the high-throughput screening (HTS) method. ...	39
Table 2. 2. Working-time comparison between standard screening (STS; 96 colonies) and high throughput screening (HTS; 96 colonies) cPCR method.....	40
<u>Chapitre 3</u>	
Table 3. 1. Summary of stable recombinant <i>C. reinhardtii</i> cells.....	72
<u>Annexe A</u>	
Table A. 1. Genomic DNA concentration obtained after HT DNA extraction in a 96-well plate.	126
Table A. 2. Reaction master mix preparation.	128
<u>Annexe B</u>	
Table S. 1. List of primers used in this study for cloning, colony-PCR, and RT-qPCR.....	142
Table S. 2. Gene sequences used in this study.....	146
Table S. 3. Analytical parameters used for compound identification using high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD).	153
Table S. 4. Optimized instrumental parameters used for HPLC-MS/MS analyses in ESI+.	154
Table S. 5. CBGA peak areas obtained with the <i>C. reinhardtii</i> WB ⁺ transformants.....	157

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
<u>Chapitre 1</u>	
Figure 1. 1. Trichomes glandulaires de <i>C. sativa</i>	2
Figure 1. 2. Système endocannabinoïde :	4
Figure 1. 3. Marché du cannabis :	5
Figure 1. 4. Voie de biosynthèse des cannabinoïdes :	8
Figure 1. 5. Généalogie de <i>C. reinhardtii</i>	17
Figure 1. 6. Cycle de vie et anatomie de <i>C. reinhardtii</i>	19
Figure 1. 7. Stratégies de production des CBs chez <i>C. reinhardtii</i>	24
<u>Chapitre 2</u>	
Figure 2. 1. First round of selection and maintenance of transformants.....	33
Figure 2. 2. High throughput DNA extraction and time correlation for each step.....	35
Figure 2. 3. PCR reaction mix preparation and aliquoting.	36
Figure 2. 4. Antibiotic selective TAP agar plate containing genetically transformed <i>C. reinhardtii</i>	37
Figure 2. 5. Example of stained SYBR safe agarose gel (1%) showed amplicon of 48 samples.	38
<u>Chapitre 3</u>	
Figure 3. 1. Overview representation of the cannabinoid biosynthetic pathway.	51

Figure 3. 2. Expression of <i>NphB</i> and <i>CBDAS</i> in <i>E. coli</i>	64
Figure 3. 3. Genetic constructs used in the present study.	65
Figure 3. 4. Relative expression of <i>NphB</i> and <i>CBDAS</i> over <i>histone H3</i> transcripts.	67
Figure 3. 5. NphB protein detection by Western blot.....	71
Figure 3. 6. Functional NphB protein is accumulated in <i>C. reinhardtii</i> strains.	74

Chapitre 4

Figure 4. 1. Évaluation de l'expression des transgènes et de la croissance cellulaire au cours du temps chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	99
---	----

Annexe A

Figure A. 1. The recombinant Vector map.	125
Figure A. 2. Linearized plasmid pOpt_mRuby2_Hyg containing the Gene of Interest.....	125

Annexe B

Figure S. 1. Recombinant vectors used for <i>C. reinhardtii</i> nuclear transformation.	129
Figure S. 2. Recombinant vectors <i>E. coli</i> transformation.	130
Figure S. 3. Calibration curves used for sample analysis by HPLC-DAD.	131
Figure S. 4. Chromatograms of samples analyzed after <i>in vitro</i> enzymatic assay.	132
Figure S. 5. Colonies obtained after the nuclear transformation of <i>C. reinhardtii</i>	133
Figure S. 6. Illustration of 1% agarose gels showing transgenes amplicons after PCR screening of the selected transformants.	135
Figure S. 7. <i>C. reinhardtii</i> PCR-positive transformants characterization for the expression of the transgene.	136

Figure S. 8. HPLC-DAD analysis of <i>in vitro</i> enzymatic assay samples generated with the <i>C. reinhardtii</i> expressing C1 transgènes.....	137
Figure S. 9. Example of CBGA signal detection by HPLC-MS/MS for a <i>C. reinhardtii</i> clone expressing NphB.....	138
Figure S. 10. Confirmation of CBGA mass-to-charge (m/z).	139
Figure S. 11. HPLC-DAD detection of CBGA in <i>C. reinhardtii</i> samples producing NphB.....	140
Figure S. 12. HPLC-DAD and HPLC-MS/MS chromatograms after metabolite analysis.....	141

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviations

%GC	Contenu en nucléotides guanine et cytosine
AAE1	Acyl activatrice d'enzyme 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APT	Aromatique prényltransférase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomale
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
ATP synthase	Adénosine triphosphate synthase
bp	Paire de base
CAGR	Taux de croissance annuel composé
CBC	cannabichromène
CBCA	Acide cannabichroménique
CBCAS	Acide cannabichroménique synthase
CBD	Cannabidiol
CBDA	Acide cannabidiolique
CBDAS	Acide cannabidiolique synthase
CBDVA	Acide cannabidivarinique
CBG	cannabigérol
CBGA	Acide cannabigérolique
CBGAS	Acide cannabigérolique synthase
CBs	Cannabinoïdes
CoA	Coenzyme A
cPCR	PCR sur colonie
Cs	<i>Cannabis sativa</i>

CsaPT	Aromatique prényltransférase de <i>Cannabis sativa</i>
DAD	Détecteur à réseau de diodes
EndoH	Endoglycosidase H
FAD	Flavine adenine dinucleotide
FDA	Food and Drug Administration
FMDV2A	Peptide 2A provenant du virus causant le syndrome pieds-mains-bouche
gDNA	ADN génomique
GPP	Géranyle diphosphate
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPLC-DAD	Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur à réseau de diodes
HPLC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide à haute performance avec spectrométrie de masse en tandem
HTS	High-throughput screening
kbp	Mille paires de base
Kcat	Constante catalytique
Km	Constante de Michaelis-Menten
m/z	Masse d'un ion divisée par sa charge
MBP	Maltose binding protein
Mbp	Million de paires de base
MS	Mass spectrometry
<i>mt</i>	Matting type
NphB	Naptherpin biosynthetic cluster gene B
OA	Acide olivetolique
OAC	Acide olivetolique cyclase
OAS	Acide olivetolique synthase
OD	Densité optique
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PGK	Phosphoglycérate kinase
PKS	Polykétide synthase
PMPs	<i>Plant-made pharmaceuticals</i>

ppm	Partie par million
rpm	Rotation par minute
RT-qPCR	PCR quantitative à la suite Transcription inverse
STS	Standard screening
THC	Tétrahydrocannabinol
THCA	Acide Tétrahydrocannabinolique
THCAS	Acide Tétrahydrocannabinolique synthase
TKS	Tétrakétide synthase
UTR	Région non traduites
WT	Type sauvage

Acronymes

µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
%	Pourcentage

I. CHAPITRE 1

I. 1. INTRODUCTION

1. 1. Généralité sur les cannabinoïdes

1. 1. 1. Définition

Les cannabinoïdes (CBs) représentent une famille de composés terpénophénoliques dont certains possèdent des propriétés psychotropes ou bioactives, capables d'activer les récepteurs cannabinoïdes présents dans le corps humain et chez les mammifères. Trois groupes de CBs reparties selon leur origine existent: les endocannabinoïdes produits chez les humains et les mammifères, les cannabinoïdes synthétiques obtenus par synthèse chimique, et les phytocannabinoïdes produits par les plantes (Andre et al., 2016; Degenhardt et al., 2017; Hesami et al., 2020; Thiebot et Labat, 2021).

1. 1. 2. Les phytocannabinoïdes

Les phytocannabinoïdes, communément appelés CBs, sont naturellement produits par la plante de *Cannabis sativa* (*C. sativa*). Toutefois, certaines espèces de plantes à fleurs telles que le *Rhododendron*, de plante hépatique du genre *Radula*, ainsi que certains champignons et légumineuses ont été identifiés capables de produire des CBs. À date, plus d'une centaine de CBs ont été identifiés et les plus connus et étudiés sont le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), le cannabidiol (CBD), le cannabichromène (CBC), le cannabinol (CBN), et leur précurseur principal, l'acide cannabigérolique (CBGA) (Degenhardt et al., 2017; Gülck et Möller, 2020; InMed, 2020; Tahir et al., 2021).

1. 1. 3. Sites de synthèse et d'accumulation des cannabinoïdes chez *Cannabis sativa*

Chez *C. sativa*, les CBs, les terpènes, et d'autres métabolites spécialisés sont synthétisés et stockés en grande partie dans des structures multicellulaires considérées comme usines cellulaires naturelles appelées trichomes glandulaires. Ces trichomes glandulaires recouvrent quasiment toute la partie aérienne de la plante de cannabis (**Figure 1.1**), principalement les feuilles et les fleurs, avec une accumulation plus importante au niveau des fleurs femelles (Gülck et Möller, 2020; Huchelmann et al., 2017; Livingston et al., 2020). Des études microscopiques, transcriptomiques, et métabolomiques des trichomes glandulaires de *C. sativa* montrent que leur structure est

constituée d'une tige multicellulaire, de plusieurs cellules de sécrétion ou cellules discales ou glandulaires, et d'une cavité de stockage (**Figure 1.1**). Les cellules discales constituent le compartiment cellulaire où les pré-synthèses impliquées dans la voie métabolique de biosynthèse des terpènes et des intermédiaires des CBs sont exprimées et accumulées. Une fois synthétisé, le principal intermédiaire des CBs, l'acide cannabigérolique (CBGA) est exporté par un mécanisme peu connu au niveau des vésicules de sécrétion où il sera converti en divers CBs par des synthèses de CBs (**Figure 1.1**). Après leur synthèse, les CBs sont accumulés sous forme de gouttelette lipidique au niveau des cavités de stockage (Hesami et al., 2020; Livingston et al., 2020; Romero et al., 2020).

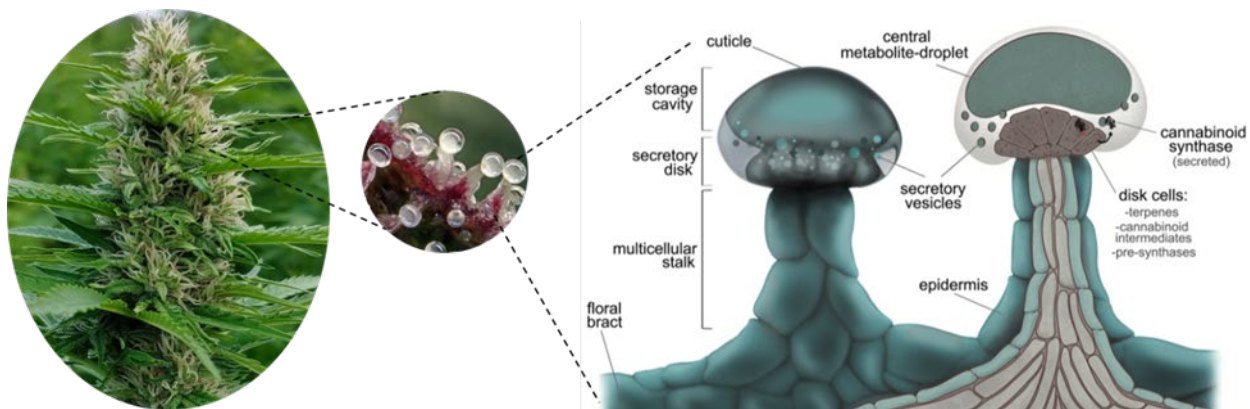


Figure 1. 1. Trichomes glandulaires de *C. sativa*.

Présentation détaillée des trichomes recouvrant la partie aérienne d'une plante de cannabis accumulant des CBs. À gauche est la représentation d'une fleur femelle (photo crédit : Serge Nouemssi); au centre, des trichomes glandulaires vue au microscope; et à droite, une illustration de deux trichomes à tiges capitée accumulant des CBs obtenue par microscopie multi-photonique (Clinton, 2019; Livingston et al., 2020; Romero et al., 2020).

1. 1. 4. Rôle des cannabinoïdes chez *Cannabis sativa*

Comme tout métabolite spécialisé, les CBs sont produits par les plantes au cours de leur développement pour assurer des fonctions bien précises, telles que la protection contre divers stress biotiques ou abiotiques. Chez *C. sativa*, il a été rapporté que ces métabolites protègent la plante contre les rayons ultra-violet, la sécheresse, les attaques des herbivores et des microorganismes pathogènes, et sont de ce fait considérés comme barrières chimiques de défense de la plante (Gülck et Møller, 2020). Outre leur rôle protecteur de la plante, les CBs ont été exploités en médecine traditionnelle asiatique à travers la plante de cannabis depuis des siècles, et la première documentation sur l'usage médical du cannabis remonte à environ 2700 ans avant J.-C. (Dutta, 2003; Romero et al., 2020).

1. 2. Historique de l'usage du cannabis et des cannabinoïdes et son statut légal

Exploité depuis des millénaires en pharmacopée chinoise et indienne comme anti-douleur et médicament récréatif, l'usage thérapeutique du cannabis a évolué en Afrique au 10^e siècle et a connu une grande expansion dans la médecine occidentale au cours du 19^e siècle. Cet accroissement s'est concrétisé pendant la seconde moitié du 19^e siècle par la réalisation de plusieurs travaux de recherche et la publication d'une centaine d'articles scientifiques sur l'importance thérapeutique du cannabis (Romero et al., 2020; Touw, 1981; Zuardi, 2006). Cependant, malgré ses bienfaits, l'usage légal du cannabis et des CBs à des fins médicales, récréatives ou de recherche scientifique a été débattu au début du 20^e siècle, entraînant ainsi le ralentissement des investigations sur le sujet. Par conséquent, le cannabis fut classé comme stupéfiant et prohibé à l'échelle mondiale par la convention unique sur les stupéfiants de 1961, remettant ainsi en cause les résultats précédemment obtenus et publiés sur ses propriétés thérapeutiques et son exploitation comme plante médicinale ou récréative (Romero et al., 2020). Néanmoins, l'intérêt thérapeutique du cannabis et des CBs resuscite l'attention de la communauté scientifique au cours de la même décennie grâce à l'isolation et l'identification du premier CB, le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) par le chimiste israélien Raphael Mechoulam en 1964 (Gaoni et Mechoulam, 1964). Dès lors, il s'en est suivie la découverte des récepteurs CBs (CB1 et CB2) et du système endocannabinoïde au cours des années 90, entraînant à cet effet la multiplication des axes de recherche sur l'importance médicinale du cannabis et des CBs, ainsi que leur potentiel interaction avec le système endocannabinoïde. Ces multiples investigations ont conduit à l'identification du cannabidiol (CBD) et de plus d'une centaine d'autres CBs au cours des deux dernières décennies (Crocq, 2020; Devane et al., 1992; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Compte tenu de ces avancées, la prohibition des recherches sur le cannabis et son usage à des fins thérapeutiques, récréatives ou religieuses a progressivement été levée à travers le monde. À date, il est légalisé, dépénalisé ou toléré dans plus de 38 pays dans le monde et 47 états aux États-Unis d'Amérique (Obradovic et Taiclet, 2024; Romero et al., 2020). Au regard de leurs potentialités et du nombre de publications générées jusqu'à présent sur les importances du cannabis et des CBs, il est en effet indéniable que ces derniers représentent des intérêts médicales, pharmaceutiques et économiques significatifs.

1. 3. Intérêt médical, pharmaceutique et économique du cannabis et des cannabinoïdes

1. 3. 1. Intérêt médical et pharmaceutique

Outre les effets psychoactifs auxquels ils sont généralement associés, les CBs jouent un rôle essentiel chez l'Homme et les animaux, car ils interagissent avec les récepteurs CB1 et CB2 du système endocannabinoïde dans le corps humain pour assurer la régulation de l'homéostasie (Abrams, 2018; Romero et al., 2020). Ces deux récepteurs de CBs sont répartis à travers tout le corps humain et y assurent des fonctions spécifiques une fois activés (**Figure 1.2**).

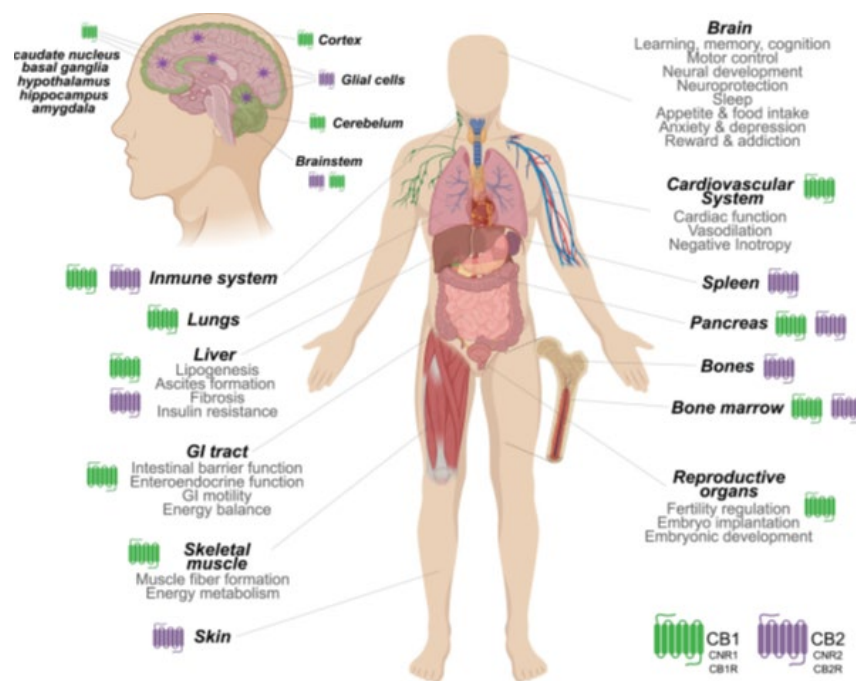


Figure 1. 2. Système endocannabinoïde :

Sites majeurs de distribution des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 à travers le corps humain et les fonctions associées (Romero et al., 2020; Zou et Kumar, 2018).

En plus de leur fonction régulatrice de l'homéostasie, les CBs ont été utilisés dans des études pré-cliniques pour le soulagement des douleurs aiguës et chroniques, ainsi que le traitement de certaines maladies, telles que les troubles neurologiques (la spasticité associée à la sclérose en plaque, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson, et le syndrome de la Tourette); les troubles psychiatriques (stress post-traumatique et la schizophrénie); le cancer et les vomissements induits par la chimiothérapie (Abd-Nikfarjam et al., 2023; Abrams, 2018; Al-Ghezi et al., 2019; Coelho et al., 2023; Hill et al., 2013; Romero et al., 2020). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence des CBs tels que le CBGA, l'acide cannabidiolique (CBDA) et l'acide

Δ^9 -tétrahydrocannabinolique (Δ^9 -THCA) comme métabolites possédant des propriétés antivirales pouvant prévenir ou traiter les infections causées par le SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) et ses différents variants (van Breemen et al., 2022).

1. 3. 2. Intérêt économique et évolution du marché du cannabis et des cannabinoïdes

L'adoption continue des lois régissant la légalisation ou la tolérance du cannabis médical ou récréatif à travers le monde prend de l'ampleur dans plusieurs pays, et la demande en cannabis et CBs ne cesse de croître. Comme résultat, une évolution significative du marché du cannabis est observée et est estimée en 2024 à 33,84 milliards USD, et pourrait d'ici 2029 atteindre la barre de 69,25 milliards USD pour la période d'étude 2019-2029, avec un taux de croissance annuel composé de 15,40% pour la période de prédiction 2024-2029 selon les études réalisées par Mordor Intelligence Research & Advisory (**Figure 1.3**) (Advisory, 2024).

Par ailleurs, avec la légalisation du cannabis récréatif au Canada en 2018, le marché du cannabis en Amérique du Nord a connu une évolution significative, faisant de la région le secteur possédant le marché de cannabis le plus important dans le monde avec environ un tiers du bénéfice total provenant de la vente du cannabis et des CBs pharmaceutiques (**Figure 1.3**) (Advisory, 2024; Dorbian, 2024). Cependant, malgré leur importance économique, pharmaceutique et médicinale, la production du cannabis et des CBs continue de faire face à de multiples contraintes qui constituent un défi majeur à l'exploitation de leur plein potentiel.



Figure 1. 3. Marché du cannabis :

Tendance de l'évolution du marché du cannabis et prédiction de la taille du marché pour la période 2024-2029 à travers le monde (Advisory, 2024).

1. 4. Contraintes liées à la production du cannabis et des cannabinoïdes

Face à l'évolution constante de la demande en cannabis et CBs, leur approvisionnement repose essentiellement sur des méthodes classiques de production telles que la culture en champs ou dans un environnement contrôlé (sous serre ou en hydroponie). Cependant, ces modes de production sont souvent soumises à des lois et réglementations visant à limiter les seuils de production à un nombre de plants défini dans certains pays, états ou régions, bien que l'usage du cannabis y soit légal, dépénalisé ou toléré. Par ailleurs, la production à grande échelle nécessite de grands espaces de culture, un temps de production pouvant s'étendre sur plusieurs mois, une main d'œuvre élevée, des ressources énergétiques importantes et par conséquent des impacts écologiques considérables. De plus, le rendement de production en champs est très variable et difficile à contrôler, car il dépend fortement des facteurs environnementaux tels que le climat, les agents pathogènes et les ravageurs (Holland, 2010; INHESJ/OFD, 2017; Prévost, 2024).

Outre les contraintes liées à la production de la matière végétale, l'obtention des CBs spécifiques à usage pharmaceutiques repose essentiellement sur l'extraction et la purification à partir des plantes. Ce qui constitue une limite importante en raison de la complexité de la matrice végétale et de la présence de plusieurs autres CBs dans la plante, affectant ainsi la quantité et la qualité du produit final qui est souvent limité aux deux CBs majeurs présent dans la plante à savoir, le Δ^9 -THC et le CBD (Gülck et al., 2020; Lewis et al., 2017; Valizadehderakhshan et al., 2021; Yoshimatsu et al., 2004).

1. 5. Voies alternatives de production des cannabinoïdes

Pour faire face aux contraintes de production des CBs, des approches alternatives telles que les synthèses chimiques sont généralement utilisées. Ces méthodes offrent des voies de synthèse partielle ou totale des CBs d'intérêt, ainsi que de nouveaux analogues. Toutefois, cette approche est peu écologique et les rendements de production sont souvent faibles, car dépendent de la complexité structurale des CBs cibles (Dattatraya H. Dethe, 2015; Shultz et al., 2018). Cependant, ces inconvénients peuvent être contournés grâce à une approche biotechnologique telle que la biologie synthétique. La biologie synthétique offre une alternative viable et durable pour la production des CBs naturels, tout en fournissant une solution plus respectueuse de l'environnement par rapport aux méthodes de production habituelles. À cet effet, l'ingénierie métabolique de certains organismes ou microorganismes peut fournir une voie compétitive et efficace à la

production hétérologue de CBs spécifiques, avec un meilleur rendement, lorsque la voie métabolique de biosynthèse naturelle des CBs cibles est élucidée (Carvalho et al., 2017).

Au cours des deux dernières décennies, plusieurs groupes de recherche ont œuvré à élucider la voie métabolique de biosynthèse naturelle des CBs chez *C. sativa*, via la caractérisation des différents gènes impliqués. En résultat, une voie métabolique bien élaborée et détaillée est à date connue, mettant en évidence l'implication de plusieurs compartiments cellulaires au niveau de la plante, ainsi que d'autres voies métaboliques qui s'interconnectent (Gagne et al., 2012; Sirikantaramas et al., 2004; Sirikantaramas et al., 2007; Sirikantaramas et al., 2005; Taura et al., 1996; Taura et al., 2007b; Taura et al., 2007c; Taura et al., 2009).

1. 6. Voie de biosynthèse des cannabinoïdes chez *Cannabis sativa*

La biosynthèse naturelle des CBs dans la plante de cannabis se fait à travers plusieurs séries de réactions enzymatiques qui se déroulent dans des compartiments cellulaires différents au niveau des trichomes glandulaires, et implique d'autres voies métaboliques connexes (Degenhardt et al., 2017; Gülck et Møller, 2020; Romero et al., 2020). Cette biosynthèse est initiée dans le cytoplasme avec la voie métabolique de biosynthèse des acides gras, qui aboutit à la production de l'acide hexanoïque, qui, sous l'action de l'enzyme acyl-activating enzyme 1 (AAE1), est converti en hexanoyl-CoA (Stout et al., 2012). L'hexanoyl-CoA est condensé à trois molécules de malonyl-CoA par une tétraketide synthase de type III (TKS), pour générer un intermédiaire instable, le 3,5,7-trioxododécanoyl-CoA (**Figure 1.4**). Cet intermédiaire est converti en acide olivetolique (OA) par l'activité de l'acide olivetolique cyclase (OAC), à travers une réaction de condensation aldolique intramoléculaire C2 → C7 de sa chaîne aliphatique (**Figure 1.4**). Parallèlement, les fractions isoprénylées sont synthétisées à partir de l'acétyl-CoA via la voie du mévalonate (MVA) dans les péroxysomes, ou à partir du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate à travers la voie du méthylerythritol 4-phosphate (MEP) dans les plastides, pour générer le géranyle pyrophosphate (GPP). Au niveau des plastides, l'acide cannabigérolique synthase (CBGAS) ou l'aromatique prényltransférase (APT) catalyse le transfert du groupement isoprénylé du GPP sur le cycle aromatique de OA pour produire le principal intermédiaire des CBs, le CBGA (**Figure 1.4**). Le CBGA est ensuite transporté par un mécanisme peu connu dans l'apoplasme des trichomes glandulaires de la plante, où il sera converti en Δ^9 -THCA, CBDA ou acide cannabichroménique (CBCA) sous l'action des oxydocyclases acide tétrahydrocannabinolique synthase (THCAS), acide cannabidiolique synthase (CBDAS) ou acide cannabichroménique synthase (CBCAS),

respectivement (**Figure 1.4**). Les formes décarboxylées Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD) et cannabichromène (CBC) peuvent être obtenus à la suite d'une décarboxylation spontanée non enzymatique provoquée par la chaleur, la lumière ou l'oxygène atmosphérique (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Dussy et al., 2005; Gagne et al., 2012; Kearsey et al., 2020; Lewis et al., 2017).

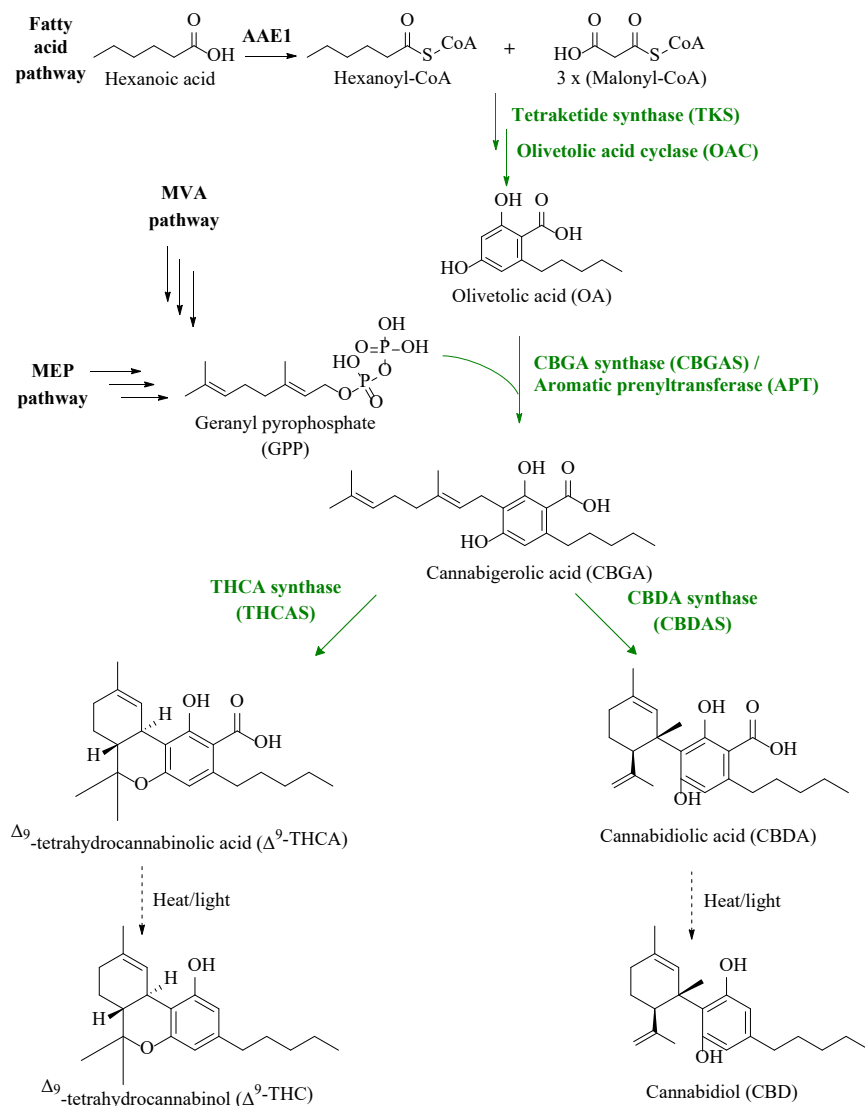


Figure 1. 4. Voie de biosynthèse des cannabinoïdes :

Voie métabolique conduisant à la production de l'acide Δ^9 -tétrahydrocannabinolique (Δ^9 -THCA) et de l'acide cannabidiolique (CBDA), à partir de leur précurseur et intermédiaire commun, l'acide olivetolique (OA) et l'acide cannabigerolique (CBGA), respectivement. La dernière étape de la voie métabolique représentée par des flèches en pointillées est une décarboxylation non enzymatique du Δ^9 -THCA et du CBDA sous l'effet de la chaleur ou en présence de la lumière pour générer leur forme neutre Δ^9 -THC et CBD. Les flèches pleines vertes représentent la voie métabolique principale, et les noires les voies métaboliques connexes.

L'élucidation de cette voie métabolique a offert plusieurs approches de production alternatives permettant l'exploitation des systèmes de production acellulaire, ou à partir des organismes ou microorganismes hôtes. Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence l'utilisation des hôtes tels que les bactéries, les levures, les cellules d'insectes, les plantes, ou les microalgues pour la biosynthèse hétérologue des CBs (Awwad et al., 2023; Fantino et al., 2024; Geissler et al., 2018; Gülck et al., 2020; Luo et al., 2019; Qian et al., 2019; Schäfer et al., 2024; Schmidt et al., 2024; Sirikantaramas et al., 2004; Tan et al., 2018; Valliere et al., 2019; Zirpel et al., 2017; Zirpel et al., 2015).

1. 7. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes

La production hétérologue des CBs nécessite certaines exigences particulières de l'organisme hôte. Ces exigences incluent la disponibilité des souches idéales, des vecteurs, des éléments de régulation (promoteurs et terminateurs) et de localisation cellulaire (signal d'adressage cellulaire), de l'information génétique, et de l'accessibilité aux outils modernes de biologie moléculaire pour sa modification génétique et le suivi de l'expression hétérologue des gènes. Dans certains cas particuliers, les exigences sont plus spécifiques et dépendent de la voie métabolique ciblée qui peut souvent nécessiter un système de compartimentalisation cellulaire bien adapté (Carvalho et al., 2017).

1. 8. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes dans la bactérie *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est à date l'un des systèmes biologiques le plus adapté et le plus utilisé en ingénierie métabolique pour la production des protéines recombinantes, des biomolécules à haute valeur ajoutée, et des produits chimiques (Bolaños-Martínez et al., 2022). Cette bactérie a été utilisée dans certaines études pour reconstruire partiellement la voie de biosynthèse des CBs de la plante de *C. sativa* (Ayakar et al., 2020; Tan et al., 2018; Taura et al., 2009). En effet, Tan et al., ont investigué ce système pour la biosynthèse hétérologue du précurseur des CBs, l'OA, via l'ingénierie de *E. coli* avec les gènes de la *TKS* ou *OAS* et de *OAC*. Grâce à la combinaison de la voie biosynthétique avec des enzymes auxiliaires permettant l'augmentation du flux de l'hexanoyl-CoA et du malonyl-CoA, ainsi que l'intégration des modules d'inversion de la β -oxydation et l'optimisation des conditions de fermentation, ils ont été capables de produire environ 80 mg/L d'acide olivetolique *in vivo* à partir du glycérol (Tan et al., 2018).

Cependant, ce système procaryote présente des limites quant à l'expression ou à l'accumulation des gènes ou enzymes natifs de *C. sativa* en aval de la voie des polycétides, chargés de la conversion du précurseur OA en CBs finaux (Bolaños-Martínez et al., 2022; Zirpel et al., 2015). Ces gènes ou enzymes incluent notamment le CBGAS ou APT, le THCAS et le CBDAS, car ces derniers possèdent des domaines transmembranaires (CBGAS) ou des ponts disulfures et plusieurs sites de *N*-glycosylation (THCAS et CBDAS) qui rendent leur expression et accumulation difficiles chez les bactéries. À cet effet, les procaryotes apparaissent comme des hôtes inadéquats pour la biosynthèse hétérologue des CBs, car les protéines THCAS et CBDAS nécessitent une localisation cellulaire particulière pour leur bon repliement et leur stabilité. De plus, l'APT native de *C. sativa* possède plusieurs domaines transmembranaires qui, par conséquent, constitue une limite à son application biotechnologique chez les procaryotes (Carvalho et al., 2017; Luo et al., 2019; Shoyama et al., 2012; Zirpel et al., 2017; Zirpel et al., 2018a; Zirpel et al., 2015). Ainsi, l'exploitation des organismes hôtes eucaryotes constitue une alternative prometteuse permettant la reconstruction complète de la voie métabolique de biosynthèse des CBs de façon hétérologue.

1. 9. Biosynthèse hétérologue des cannabinoïdes chez des hôtes eucaryotes.

Contrairement aux procaryotes, les eucaryotes offrent une meilleure flexibilité pour la production hétérologue des biomolécules, car ils sont dotés d'un système de compartimentalisation cellulaire qui contribue au traitement post-traductionnelle des protéines hétérologues complexes ou à leur entreposage. À date, de tous les organismes hôtes eucaryotes (levures, cellules d'insecte, les plantes et les microalgues) utilisés pour la biosynthèse hétérologue des CBs, les levures, à l'instar de *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) ou *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) et de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), sont les plus exploitées (Bolaños-Martínez et al., 2022). Dans ce contexte, *S. cerevisiae* et *P. pastoris* présentent plusieurs avantages, car ils offrent une activité biocatalytique plus élevée qui peut s'expliquer par une faible concentration de protéines biosynthétiques mal repliées, et l'absence de corps d'inclusion inactifs; ils ont une habileté à glycosyler les oxydocyclases (THCAS ou CBDAS) qui entraîne une solubilité améliorée corrélée à un taux biocatalytique plus important; et enfin, ils ont la capacité de sécréter les CBs dans le milieu extracellulaire qui permet de minimiser les risques de toxicité tout en facilitant leur extraction (Taura et al., 2007a; Thomas et al., 2020).

1. 9. 1. Les levures

Comme les bactéries, les levures représentent une plateforme de production hétérologue bien développée, avec une panoplie d'outils et de techniques biotechnologiques et moléculaires disponibles, qui rendent leur manipulation génétique flexible et aisée (Baghban et al., 2019). *P. pastoris* et *S. cerevisiae* ont largement été exploités comme hôtes biotechnologiques pour la biosynthèse hétérologue des CBs au cours des deux dernières décennies. En effet, l'intégration des gènes impliqués dans la voie biosynthétique des CBs dans ces organismes hôtes, a permis non seulement, de produire des enzymes fonctionnelles, mais également de mettre en évidence des stratégies permettant d'améliorer leur production et leur activité (Bolaños-Martínez et al., 2022; Thomas et al., 2020).

Plus spécifiquement, l'expression hétérologue de la THCAS chez *P. pastoris* a permis de synthétiser la THCA à partir du CBGA, avec un taux de conversion maximum d'environ 98%. Dans cette étude, les auteurs ont été capables de produire jusqu'à 32.6 mg/L de THCA, grâce à l'activité de l'enzyme THCAS après optimisation (Taura et al., 2007a). Ainsi, avec *P. pastoris*, Taura et al., ont généré une THCAS ayant une efficacité catalytique (k_{cat}/k_m) 12 fois supérieure à celle produite chez les cellules d'insectes génétiquement modifiées par Sirikantaramas et al. en 2004. Une différence qui a été expliquée par un possible repliement plus efficace de la THCAS provenant de *P. pastoris* par rapport à celle synthétisée chez les cellules d'insecte. De plus, le traitement des enzymes THCAS de *P. pastoris* avec une endoglycosidase H (EndoH) a permis de générer des formes déglycosylées de THCAS plus actives que les formes glycosylées, contrairement aux enzymes THCAS provenant des cellules d'insectes qui se dénaturaient après traitement à l'EndoH (Sirikantaramas et al., 2004; Taura et al., 2007a).

Huit années plus tard, Zirpel et al., rapportent une activité catalytique de la THCAS synthétisée chez *P. pastoris* supérieure à celle obtenue dans les travaux antérieures (Zirpel et al., 2015). Dans leur étude, ils ont optimisé les conditions d'expression de la THCAS dans *P. pastoris* et *S. cerevisiae* en fusionnant la séquence du gène *THCAS* avec la séquence codant pour le signal de localisation vacuolaire de chacun des organismes respectivement. Partant de l'hypothèse que les protéases de la vacuole dégraderaient la protéine d'intérêt, ils ont généré des souches transgéniques de levure dans lesquelles le gène *PEP4* codant pour la protéinase A, était éliminé par recombinaison homologue des transgènes (Zirpel et al., 2015). Ainsi, en combinant ces stratégies d'expression de *THCAS* à l'optimisation des conditions de culture et d'activité enzymatique, ils

ont été capables de synthétiser une THCAS dans *P. pastoris* ayant une augmentation d'activité catalytique de 6350 % par rapport à celle rapportée par Taura et al. en 2007. À cet effet, ils ont été capables de produire jusqu'à 360 mg/L de THCA *in vivo*, à partir du CBGA en utilisant les cellules entières de *P. pastoris* accumulant la THCAS (Taura et al., 2007a; Zirpel et al., 2015). Plus tard, des travaux plus approfondies de ce même groupe de recherche ont permis d'une part, de produire jusqu'à 82 ± 4.6 pmol/L/OD/h de THCA *in vivo* à partir de OA et du GPP dans *P. pastoris*, grâce à la coexpression des gènes de l'aromatique prényl transférase soluble *NphB* issue de la souche CL190 de *Streptomyces sp.*, et de *THCAS* de *C. sativa* (Zirpel et al., 2017). D'autre part, leurs différentes investigations ont conduit à l'identification des facteurs limitant pouvant influencer le bon repliement de la THCAS, tout en mettant en évidence des voies de contournement. En effet, ils ont démontré que la coproduction de la foldase et de la protéine disulfure isomérase (PDI1p), de la protéine chaperonne associée à la glycoprotéine (CNE1p), de la FAD synthase (FAD1p), de la chaperonne Kar2p, et de l'activateur transcriptionnel Hac1p lié à l'UPR, augmentait l'activité de la THCAS dans les cellules de *P. pastoris*. Ce qui a à cet effet conduit à la production d'un maximum de 3,05 g/L de THCA (Zirpel et al., 2018a). De plus, la modification de certains acides aminés de la séquence des gènes de *THCAS* et de *CBDAS* par mutagenèse dirigée, suivi de leur expression dans *P. pastoris*, a abouti à la production des CBs majeurs (THCA, CBDA, et CBCA) et d'autres métabolites possédant le squelette de base des CBs. Ainsi, cette approche a permis de générer des variants de *CBDAS* et *THCAS* mutés présentant des activités catalytiques de 2,8 à 3,3 fois et de 1,7 à 2 fois plus élevées par rapport aux séquences natives, respectivement (Zirpel et al., 2018b).

Dans la même lancée, Luo et al., ont réussi à reconstruire la voie métabolique complète de biosynthèse des CBs chez *S. cerevisiae*. En utilisant le galactose comme source de carbone, ils ont pu produire le précurseur OA et les CBs majeurs retrouvés chez *C. sativa*, incluant leur principal intermédiaire commun CBGA. Cependant, pour y parvenir, ils ont introduit une voie de biosynthèse d'hexanoyl-CoA hétérologue dérivée de plusieurs organismes et reconstruit la voie native du mévalonate pour fournir un flux élevé de GPP. Incluant les gènes de la voie biosynthétique des CBs, ils ont introduit plus d'une trentaine de gène dans plusieurs souches de *S. cerevisiae* afin d'aboutir *in vivo*, à la production de 3 mg/L de OA, 136 mg/L de CBGA, 8 mg/L de THCA, 4,8 mg/L de THCVA, 4,3 µg/L de CBDA, et 6 µg/L de CBDVA (Luo et al., 2019). Outre les travaux susmentionnés, de récentes investigations menées dans *S. cerevisiae* ont permis de

généraliser des souches transgéniques capables de produire des CBs ainsi que leur précurseur à partir du glucose (Gülck et al., 2020; Schäfer et al., 2024).

1. 9. 2. Les cellules d'insecte

Le système d'expression baculovirus-cellule d'insecte a longtemps été exploité comme une plateforme biotechnologique précieuse, car il offre une variété d'applications dans la production de protéines recombinantes, la fabrication de vaccins, la thérapie tissulaire et l'expression transitoire (Kost et al., 2005; Tsai et al., 2019). Les cellules d'insectes hôtes ont la particularité d'exposer les protéines étrangères sur l'enveloppe virale après expression (Bolaños-Martínez et al., 2022; Kost et al., 2005). Ce système offre des avantages tels que la modification post-traductionnelle, une grande capacité d'insertion et la préservation des structures multimériques natives d'une protéine de fusion avec des processus de purification relativement faciles (Tsai et al., 2019). Toutefois, l'usage des cellules d'insecte comme hôte pour la production hétérologue des CBs est très peu exploité contrairement aux levures et bactéries. L'une des investigations de ce système pour la synthèse hétérologue des CBs, notamment le THCA, a démontré que la plateforme baculovirus-cellules d'insecte a permis la surexpression du gène de la *THCAS* qui présentait une activité enzymatique élevée. Grâce à ce système, les auteurs ont pu produire 1 mg/L de THCA dans le milieu de culture (Sirikantaramas et al., 2004).

1. 9. 3. Les plantes

L'ingénierie génétique des plantes pour la production hétérologue des protéines thérapeutiques ou des molécules bioactives d'intérêt économique et pharmaceutique, a connu une grande expansion au cours des trois dernières décennies. En général, l'exploitation des plantes transgéniques comme système d'expression pour la production de PMPs (*plant-made pharmaceuticals*) implique des coûts de production réduits et une expansion plus facile pour une production à grande échelle par rapport aux systèmes de culture cellulaire comme les bactéries, les champignons et les cellules de mammifères (Gomord et al., 2010; Shanmugaraj et al., 2020a; Thomas et al., 2002). À ce jour, un nombre important de PMPs incluant les anticorps, les vaccins, les antigènes et d'autres protéines d'intérêt médicinal ou nutritionnel ont été produits via des plantes transgéniques du genre *Nicotiana*, plus spécifiquement *Nicotiana benthamiana*, qui est la plante modèle majoritairement exploitée à cette fin (Donini et Marusic, 2019; Hamel et al., 2024; Rattanapisit et al., 2020; Shang et al., 2018; Shanmugaraj et al., 2020b). Cependant, cette approche fait face à des contraintes qui

constituent une limite à sa commercialisation, notamment les lois et les réglementations incertaines, la nécessité de grand espaces pour la culture, la faible productivité, le coût élevé des procédés d'extraction et de purification des métabolites d'intérêt en aval du processus de production, à la différence des systèmes d'expression microbien ou de cellules de mammifères déjà bien établis (Bolaños-Martínez et al., 2022; Schillberg et Finnern, 2021).

Plusieurs études ont exploité les plantes de *N. benthamiana* comme plateforme hétérologue d'expression, de caractérisation et d'élucidation de la localisation subcellulaire des gènes de *C. sativa* impliqués dans la voie métabolique de biosynthèse des CBs (Bolaños-Martínez et al., 2022; Bolaños-Martínez et al., 2025; Sirikantaramas et al., 2005). Notamment, le gène de *THCAS* a été cloné et exprimé dans les racines de tabac. Cette approche a abouti à l'accumulation d'une protéine active, qui en présence de son substrat CBGA (1 mg), a permis la production d'un maximum de THCA de 82 µg au bout de 2 jours d'incubation d'une culture racinaire de tabac transgénique supplémentée avec du CBGA (Sirikantaramas et al., 2004). Par ailleurs, d'autres travaux ont exploré le système d'expression transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana* via la transformation médiée par *Agrobacterium tumefaciens*, pour exprimer et caractériser les gènes *AAEI*, *OLS*, *OAC*, *CsaPT4*, *THCAS* et *CBDAS*. Dans ces études les auteurs ont pu démontrer que la localisation de la *THCAS* dans le réticulum endoplasmique contribuait à sa stabilité et son activité. De plus, l'exploitation de ce système a permis non seulement la production des CBs, mais également des CBs glucosides, mettant ainsi en évidence la contribution des enzymes de la voie métabolique dans la diversité des CBs (Bolaños-Martínez et al., 2025; Geissler et al., 2018; Gülck et al., 2020).

1. 9. 4. Les microalgues

Bien que plusieurs propriétés intellectuelles sur l'exploitation des microalgues comme plateforme biotechnologique de biosynthèse hétérologue des CBs existent (Bolaños-Martínez et al., 2022), la première preuve de concept évidente publiée sur l'utilisation des microalgues comme système de production hétérologue des CBs a été réalisée dans la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* par notre équipe de recherche. En effet, cette microalgue brune a récemment été utilisée comme plateforme hétérologue pour la production du précurseur OA et du principal intermédiaire CBGA des CBs (Awwad et al., 2023). Pour ce faire, Awwad et al., ont intégré avec succès les gènes *TKS* et *OAC* de *C. sativa* dans *P. tricornutum* extrachromosomiquement (pour une expression épisomique) par la méthode de transformation par conjugaison. Grâce à cette technique,

les auteures ont pu générer des cellules transconjugantes accumulant les protéines TKS et OAC actives. Ainsi, elles ont été capables de produire *in vivo* pendant un certain temps avant la perte d'activité des enzymes, des concentrations de OA allant de 0,6 à 2,6 mg/L sans supplémentation de substrats, car les précurseurs hexanoyl-CoA et malonyl-CoA seraient naturellement synthétisés par *P. tricornutum*. En effet, d'après les auteures, l'hexanoyl-CoA serait produit à travers la voie de β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes, tandis que le malonyl-CoA proviendrait de l'activité d'une acyl-CoA carboxylase (ACCase), ce qui les rend ainsi disponibles pour les enzymes TKS et OAC dans la réaction de biosynthèse de OA chez *P. tricornutum* (Awwad et al., 2023; Fantino et al., 2024). Dans des travaux ultérieurs réalisés par Fantino et al., l'expression d'un variant muté de l'aromatique prényl transférase soluble (*NphB_{G286S/Y288A}*) dans *P. tricornutum* via différentes approches de transformations, a conduit à l'accumulation d'une NphB active. En effet, grâce aux méthodes de transformation par conjugaison pour une expression épisomique ou extrachromosomique (EE), et par biolistique pour une expression intrachromosomique ou par intégration aléatoire du transgène dans le génome de la cellule hôte (RICE), ils ont pu générer des souches transgéniques NphB EE et NphB RICE. Les tests d'activité enzymatique de NphB effectués à partir des extraits protéiques totaux des transformants positifs et de 2 mM de OA et de GPP comme substrats ont abouti *in vitro*, à la production du CBGA à des concentrations de $17,8 \pm 0,3$ mg/L et de $19,6 \pm 0,3$ mg/L pour les fractions NphB EE et NphB RICE, respectivement. Par ailleurs, la supplémentation dans des conditions optimales des cultures liquides de 6 jours réalisées à partir des souches NphB EE et NphB RICE avec les substrats OA et GPP à 2 mM, a permis de produire du CBGA *in vivo* à $4,1 \pm 0,2$ mg/kg de biomasse fraîche avec les souches NphB EE, et à $1,7 \pm 0,2$ mg/kg de biomasse fraîche avec les souches NphB RICE, respectivement (Fantino et al., 2024). Cependant, l'expression extrachromosomique chez *P. tricornutum* pourrait constituer un facteur limitant de biosynthèse des CBs à long terme car il a été rapporté qu'après transformation, l'épisome subirait des réarrangements au cours du temps qui pourraient entraîner la perte de l'expression des gènes ou la perte de fonction des protéines d'intérêt (Awwad et al., 2023; Diamond et al., 2023). Ainsi, toujours dans l'optique de recherche d'une plateforme idéale de production hétérologue des CBs de façon stable et durable au cours du temps, la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* représente une potentielle alternative très peu explorée.

1. 10. La microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

1. 10. 1. Définition et généralités

La microalgue verte *C. reinhardtii* représente un groupe de microorganismes unicellulaires eucaryotes photosynthétiques diversifiés, qui peuple les eaux douces et les sols humides. Avec ses trois génomes (nucléaire, chloroplastique et mitochondrial) complètement séquencés, c'est un microorganisme autotrophe facultatif ayant un cycle de vie sexué et asexué, une reproduction rapide et dont la culture est facile et peu coûteuse (Salomé et Merchant, 2019; Scaife et al., 2015). Des études réalisées sur *C. reinhardtii* ont démontré qu'elle peut servir de modèle permettant de tester l'ingénierie génétique (Schroda et Remacle, 2022). En effet, elle a été utilisée comme hôte pour l'élucidation de la voie métabolique de biosynthèse des kéto-caroténoïdes chez plusieurs espèces de plantes. Également, *C. reinhardtii* peut être exploitée comme une plateforme de production de protéines recombinantes, de métabolites d'intérêt industriel tels que le bioéthanol et les bioproduits ou médicaments (Scranton et al., 2015; Siaut et al., 2011; Tran, 2019). Ayant une organisation structurale proches des plantes, sa compartimentalisation cellulaire et son caractère photoautotrophe lui confère une habilité particulière (par rapport aux autres microorganismes: bactéries et levures) dans la synthèse hétérologue des métabolites d'intérêt. De plus, ses trois génomes peuvent être exploités pour l'expression hétérologue des gènes, offrant ainsi une flexibilité de son exploitation comme plateforme de production des protéines recombinantes et de la biosynthèse hétérologue de divers métabolites d'intérêt (Merchant et al., 2007; Salomé et Merchant, 2019).

1. 11. Origine, taxonomie, cycle de vie et anatomie de *Chlamydomonas reinhardtii*

1. 11. 1. Origine et taxonomie

D'après la littérature, la lignée cellulaire de *C. reinhardtii* a divergé des plantes terrestres il y a plus d'un milliard d'année, et partage plusieurs gènes en commun avec le règne végétal et animal. Cette microalgue a été utilisée comme modèle pour l'étude de la biologie du chloroplaste, de la photosynthèse, de la structure et du fonctionnement des flagelles végétaux, du contrôle du cycle cellulaire et de certaines caractéristiques génomiques qu'elle partage avec les animaux (Harris, 2001; Keller et al., 2005; Merchant et al., 2007). Appartenant au domaine ou empire des eucaryotes, *C. reinhardtii* fait partie du règne des *Plantae*, du sous-règne des *Viridiplantae*, de l'embranchement des *Chlorophyta* et de la classe des *Chlorophyceae* (**Figure 1.5**).

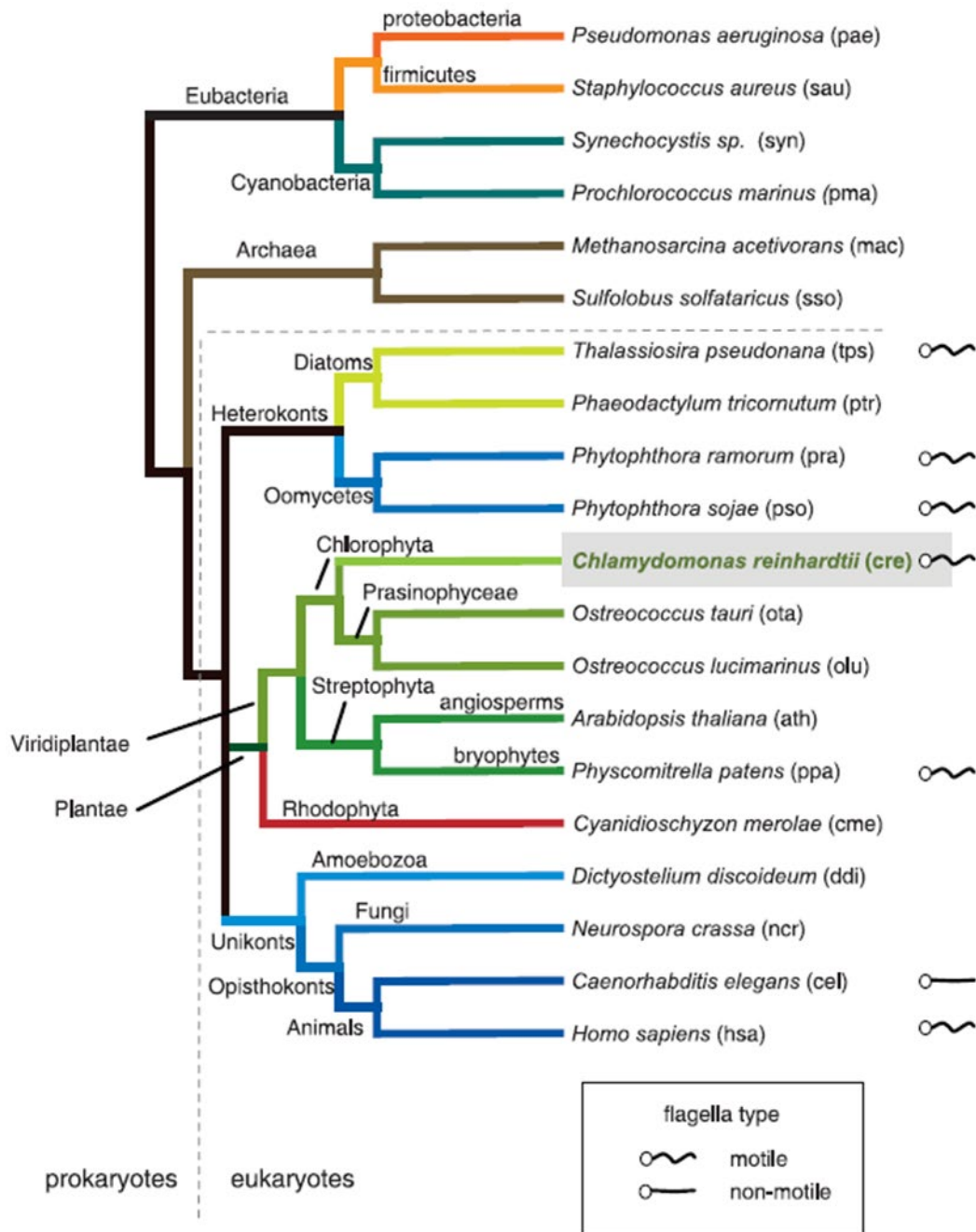


Figure 1. 5. Généalogie de *C. reinhardtii*.

Arbre phylogénétique montrant la proximité entre la microalgue verte *C. reinhardtii*, les plantes et le règne animal (Merchant et al., 2007).

1. 11. 2. Cycle de vie et anatomie

C. reinhardtii se multiplie suivant deux modes de reproduction ou cycles de vie: la reproduction végétative et la reproduction sexuée. Toutefois, ces deux modes s'alternent au cours de son cycle de développement en fonction des conditions du milieu de croissance. Ainsi, lorsque les conditions de croissance sont favorables, c'est-à-dire en présence de nutriments (source d'azote), les cellules se multiplient suivant le cycle de vie végétatif par simple division mitotique. Ce qui aboutit à la formation de deux cellules filles qui portent une information génétique encodée par ses génomes (nucléaire, chloroplastique et mitochondrial) identique à celle des parents (**Figure 1. 6 A**). Cependant, lorsque les conditions de vie deviennent défavorables (source d'azote déficiente), les cellules végétatives se différencient en gamètes de reproduction (*mating type*, *mt+* et *mt-*). Ces gamètes vont par la suite fusionner leur noyau pour générer une cellule œuf ou zygote (**Figure 1. 6 A**). En culture sous lumière constante, les cellules de *C. reinhardtii* peuvent se diviser toutes les 8 à 10 heures, mais le cycle cellulaire peut être allongé jusqu'à 24 heures en imposant une photopériode de lumière/obscurité bien définie (Salomé et Merchant, 2019).

Souvent considérée comme une micro plante, l'étude anatomique de *C. reinhardtii* montre que l'organisation structurale de ses organites est similaire à celle d'une cellule végétale. La cellule a une forme ovale, mesure environ 10 µm de diamètre, et est entourée d'une paroi cellulaire composée de glycoprotéines et de glucides disposés en sept couches (Goodenough et Heuser, 1985; Poulhazan et al., 2024). Elle est principalement constituée d'un noyau, d'un large chloroplaste qui occupe à peu près la moitié du volume cellulaire, de plusieurs mitochondries et de deux cils ou flagelles (**Figure 1. 6 B**). Ces flagelles jouent un rôle important dans la phototaxie en optimisant l'exposition des cellules à la lumière pendant la photosynthèse et dans la reconnaissance cellule-cellule au cours de la reproduction sexuée (Harris, 2009; Salomé et Merchant, 2019). Le séquençage des génomes de *C. reinhardtii* révèle qu'elle a un génome nucléaire d'une taille d'environ 120 millions de paires de base (Mbp), organisé en 17 chromosomes et contient environ 15143 gènes avec un pourcentage de base G et C (%G+C) élevé, soit d'environ 64% du génome entier et 68% pour les séquences codantes (Merchant et al., 2007). Contrairement au génome nucléaire, chaque cellule contient environ 80 copies de génome chloroplastique de taille plus réduite, mesurant environ 205 kbp et organisé en grands complexes protéines-ADN, appelés nucléoïdes avec un faible %G+C d'environ 34,6% (Gallagher et al., 2018; Gelvin et al., 1977; Krupinska et al., 2013). Dans chaque cellule de *C. reinhardtii*, on dénombre environ 130 copies de

génom mitochondrial, qui est une molécule linéaire de 15,8 kbp encodant 8 protéines, parmi lesquelles 7 sont des sous-unités de la chaîne respiratoire, ainsi que 3 ARNt et 15 fragments d'ARNr (Boer et al., 1985; Gallaher et al., 2018; Hamel et al., 2022; Salomé et Merchant, 2019).

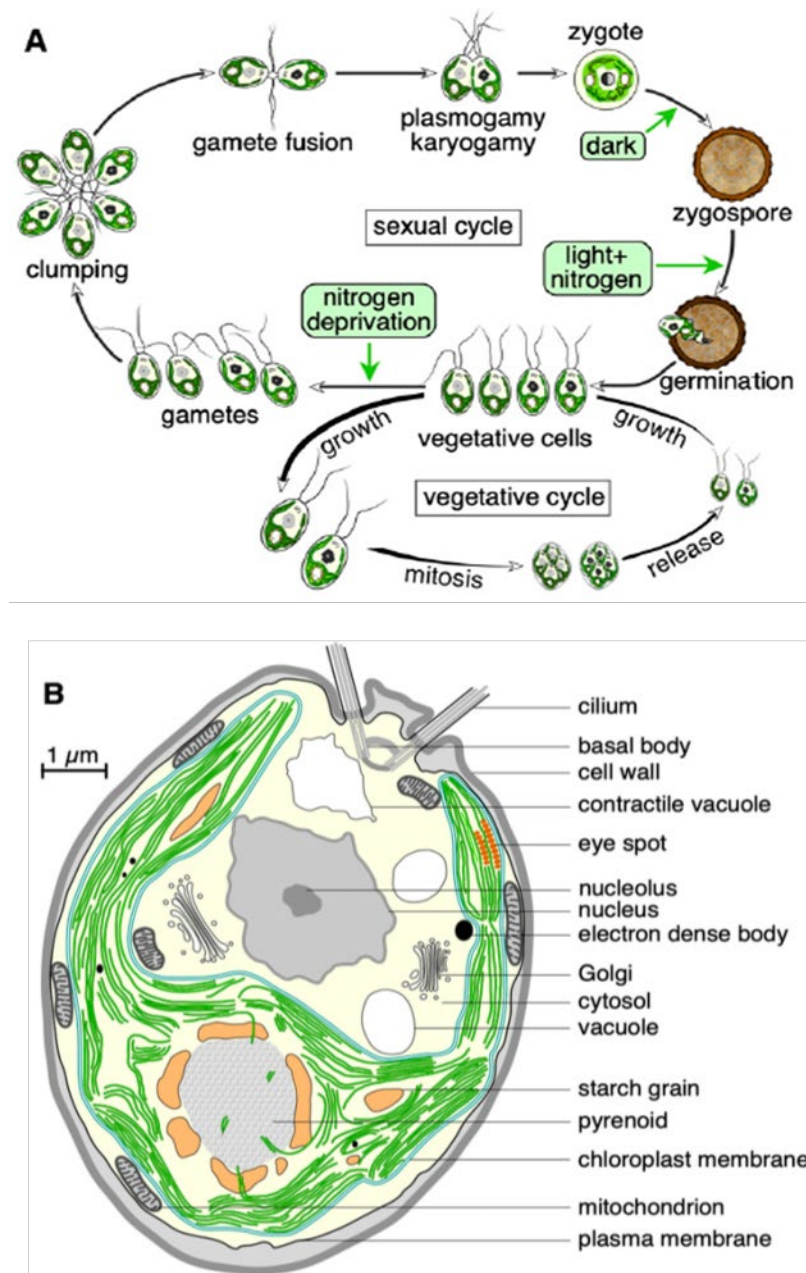


Figure 1. 6. Cycle de vie et anatomie de *C. reinhardtii*.

A) Étapes des cycles de reproduction sexuée et végétative au cours de la croissance des cellules; B) Schéma annotée d'une cellule dessinée à partir d'une image de microscopie électronique à transmission (Harris, 2009; Salomé et Merchant, 2019).

1. 12. Potentialités de *C. reinhardtii* pour la production naturel et hétérologue des molécules d'intérêt

À date, *C. reinhardtii* intéresse de façon exponentielle la recherche appliquée pour la production naturelle ou hétérologue de molécules bioactives, ceci en partie grâce aux avancées biotechnologiques et du génie génétique permettant sa manipulation et sa modification génétique à ces fins (Bolaños-Martínez et al., 2022). En effet, les attributs distinctifs de cette microalgue ont attiré l'attention des biotechnologues, qui utilisent des outils moléculaires avancés pour l'exploiter comme usines vertes afin de fabriquer des produits à haute valeur ajoutée. Ces attributs incluent leur capacité à offrir des modifications post-traductionnelles et une maturation appropriée pour une variété de protéines, la facilité de croissance et de culture dans des conditions autotrophes, hétérotrophes et mixotrophes de manière rentable (Bolaños-Martínez et al., 2022). De plus, elle a été approuvée comme microorganisme comestible ou *Generally Recognized as Safe (GRAS)* par la *Food and Drug Administration (FDA)*, ce qui rend sa commercialisation et son exploitation dans divers domaines favorable (Rosales-Mendoza et al., 2020; Torres-Tiji et al., 2020; Watson, 2018). De ce fait, *C. reinhardtii* a suscité une attention croissante au cours des dernières années, tant sur le plan scientifique que commercial pour son exploitation comme source de composés naturels important et précieux. Il s'agit entre autres des polysaccharides, des caroténoïdes et des acides gras à longue chaîne polyinsaturés, qui sont prisés pour leurs applications diverses dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, et cosmétiques comme nutraceutiques, principes actifs et parfums, respectivement (Bafana, 2013; El-Mekkawi et al., 2019; Kamble et al., 2018; Li et al., 2019; Liang et al., 2024; Lupette et Benning, 2020; Masi et al., 2023).

Par ailleurs, cette microalgue a servi de plateforme hétérologue pour la production des protéines recombinantes à l'instar des enzymes, de la protéine VP1 du virus de la fièvre aphteuse ou *foot-and-mouth disease (FMD)* et de la sous-unité B de la toxine cholérique, des vaccins, des anticorps, des antigènes, des hormones et des aliments (Almaraz-Delgado et al., 2014; Barahimipour et al., 2016; Demurtas et al., 2013; Masi et al., 2023; Mayfield et al., 2007; Rosales-Mendoza et al., 2012; Sun et al., 2003; Watson, 2018).

1. 13. Stratégies d'expression des transgènes dans *C. reinhardtii* et défis associés

L'une des étapes déterminantes de la modification génétique de *C. reinhardtii* est le développement d'une méthode de transformation efficace pouvant permettre de modifier aisément ses génomes.

À cet effet, plusieurs outils et techniques de transformation telles que l'électroporation, la méthode des billes de verre, le bombardement de particules ou la biolistique et la transformation médiée par *A. tumefaciens* ont été développés (Kindle, 1990; Kumar et al., 2004; Neupert et al., 2012; Wittkopp, 2018; Zhang et al., 2021). Au fil des ans, ces différents outils et techniques ont été optimisés afin de faciliter l'ingénierie génétique de son génome nucléaire ou chloroplastique pour l'expression hétérologue des gènes. Ces optimisations incluent notamment la création de nouvelles souches de microalgue avec des caractéristiques particulières, le développement ou l'optimisation des méthodes de criblage et de caractérisation des populations de microalgue transgéniques et l'aménagement d'une boîte à outils de clonage modulaire (*Moclo toolkit*) constituée de plusieurs motifs ou pièces qui offrent une grande flexibilité de choix lors du processus de clonage des gènes d'intérêts. Ces pièces ou motifs incluent entre autres les promoteurs/terminateurs, les régions de régulation non traduites 5' et 3' (5'UTR et 3'UTR), les gènes de résistances, les marqueurs de fluorescence et les peptides de localisation cellulaires ou d'excrétion (Crozet et al., 2018; Goold et al., 2024; Heitzer et Zschoernig, 2007; Hossain et al., 2020; Kindle et al., 1991; Kindle et Sodeinde, 1994; Leon et Fernandez, 2007; Molino et al., 2018; Mussnug, 2017; Neupert et al., 2009; Nouemssi et al., 2020; Nour-Eldin et al., 2018; Onishi et Pringle, 2016; Salomé, 2021; Wang et al., 2019; Weiner et al., 2018).

1. 13. 1. Expression chloroplastique

Le génome chloroplastique de *C. reinhardtii* offre de nombreuses caractéristiques intéressantes pour l'expression des transgènes. En effet, l'intégration des transgènes dans le chloroplaste se fait de façon spécifique via un processus de recombinaison homologue qui favorise l'intégration de plusieurs copies d'un transgène et élimine les effets de position. Comme résultats, des niveaux d'expression géniques élevés et stables conduisant à une accumulation importante de la protéine cible sont généralement observés. De plus, cet organe offre des modifications post-traductionnelles qui contribuent à la stabilité et à la fonctionnalité des molécules, grâce à sa capacité à produire des chaperonnes, des peptidyl-propyl isomérases et des disulfures isomérases qui favorise l'établissement des ponts disulfures (Bolaños-Martínez et al., 2022; Schroda, 2004). Cependant, malgré ses multiples avantages, son incapacité à glycosyler des protéines au niveau post-traductionnelle constitue une limite majeure de son exploitation pour la production hétérologue de certaines protéines telles que ceux de la voie de biosynthèses des CBs, notamment la THCAS et le CBDAS dont la fonctionnalité et l'activité dépendent fortement de leur niveau de

glycosylation après la traduction (Bolaños-Martínez et al., 2025; Gülck et al., 2020; Shoyama et al., 2012; Taura et al., 2007a; Zirpel et al., 2018a). Ainsi, l'exploitation du génome nucléaire de *C. reinhardtii* contribuerait à l'expression des gènes au traitement post-traductionnel des protéines plus complexes.

1. 13. 2. Expression nucléaire

Contrairement au génome chloroplastique, l'expression efficace de transgène nucléaire chez *C. reinhardtii* est particulièrement affectée par des phénomènes assez complexes. Il s'agit entre autres de l'intégration aléatoire du transgène dans le génome nucléaire, résultant à une grande variabilité du niveau d'expression du transgène dans des clones de la même génération. Le succès de cette stratégie d'expression dépend fortement du site d'insertion du transgène dans le génome, de la jonction non homologue des extrémités (*non homologous end joining*, NHEJ); et du processus de l'extinction ou de la répression génique (*silencing* en anglais). De plus, l'expression des transgènes nucléaires est fortement entravée par un faible taux de transcription chez *C. reinhardtii* et est généralement régulée par des éléments tels que les promoteurs et terminateurs, les régions non traduites 5'UTR et 3'UTR, et les introns dont les mécanismes d'action restent ambigus (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Schroda, 2019; Shahar et al., 2020). Ces régulateurs interviennent à plusieurs niveaux du processus d'expression et permettent à l'organisme hôte de s'adapter à son environnement (Barrett et al., 2012). Toutefois, ces événements peuvent conduire de façon aléatoire dans certains cas à une surexpression du transgène dans la microalgue ou à leur sous-expression. Dans l'optique de développer des processus pouvant favoriser une meilleure exploitation du génome nucléaire de *C. reinhardtii* pour l'expression hétérologue des gènes, plusieurs travaux proposent diverses stratégies. Ces stratégies incluent le développement de nouvelles souches d'algue UV-mutées, l'optimisation de la séquence d'ADN d'intérêt afin de mimer au maximum la composition nucléotidique des gènes endogènes du lieu de destination (noyau) et de minimiser les effets d'extinction génique, le choix des bons éléments régulateurs de la transcription (promoteurs, terminateurs), des marqueurs de sélections, des gènes rapporteurs et l'insertion ou non des introns dans les séquences d'ADN d'intérêt (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Jaeger et al., 2019; Lauersen et al., 2015; Lumbreras et al., 1998; Neupert et al., 2020; Neupert et al., 2009; Schroda, 2019; Weiner et al., 2018). De plus, le développement des voies de contournement aidant à réduire les niveaux d'extinction génique des transgènes au cours de l'expression nucléaire chez cet organisme hôte soutient l'établissement de son génome nucléaire

comme organite prometteur de l'expression hétérologue (Beauchemin et al., 2024; Ghribi et al., 2020; Neupert et al., 2020). Ainsi, grâce à son caractère eucaryote, la transformation nucléaire de *C. reinhardtii* comporte plusieurs avantages, tels que l'expression intracellulaire des protéines recombinantes ou une localisation vers l'appareil sécrétoire à l'aide de signal peptide approprié pour une récupération ultérieure et la capacité de leur purification à partir des milieux de culture (Bolaños-Martínez et al., 2022; Lauersen et al., 2013a; Lauersen et al., 2013b). Des études antérieures rapportent la production de métabolites à des concentrations élevées dans *C. reinhardtii*, sous des régimes phototrophiques ou photoautotrophiques via une expression nucléaire, sans affecter l'accumulation de pigments natifs ou la forme physique des cellules. Ces métabolites incluent notamment les isoprénoïdes, tels que ceux produits par la voie du méthylérythritol 4-phosphate (MEP) chez *C. sativa* (Einhaus et al., 2022; Lauersen et al., 2018; Zhao et al., 2022). En effet, cette capacité à produire des briques élémentaires de constitution structurale des CBs, suggère que cette microalgue pourrait servir de plateforme idéale pour la production hétérologue des CBs. De plus, avec les avancées du génie génétique qui offre une grande variété de techniques et de stratégies de transformation de son génome nucléaire ou chloroplastique, l'intérêt de l'exploitation de *C. reinhardtii* pour la production des CBs ne cesse de croître (Bolaños-Martínez et al., 2022).

I. 2. Hypothèses de recherche

Au regard de toutes les potentialités que présente la microalgue verte *C. reinhardtii*, son ingénierie métabolique via l'intégration dans son génome nucléaire des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse naturelle des CBs, peut aboutir au développement d'une plateforme verte de production hétérologue des CBs de façon stable et durable (**Figure 1.7**). Cependant, chez *C. sativa*, la synthèse du CBGA est une étape déterminante de la voie biosynthétique, car c'est l'intermédiaire principal duquel dérivent tous les autres CBs. Mais, cette étape clé est régulée par une aromatique prényltransférase (APT) qui possède plusieurs domaines transmembranaires localisés au niveau des plastides, ce qui représente une contrainte majeure à son expression fonctionnelle dans des systèmes hétérologues. Dans ce contexte, la substitution du gène encodant cette enzyme par celui de l'aromatique prényltransférase soluble *NphB* issu de la souche CL190 de *Streptomyces* sp., représente une alternative prometteuse permettant d'évaluer la production cytosolique de CBGA, ainsi que celle d'autres CBs, chez *C. reinhardtii*.

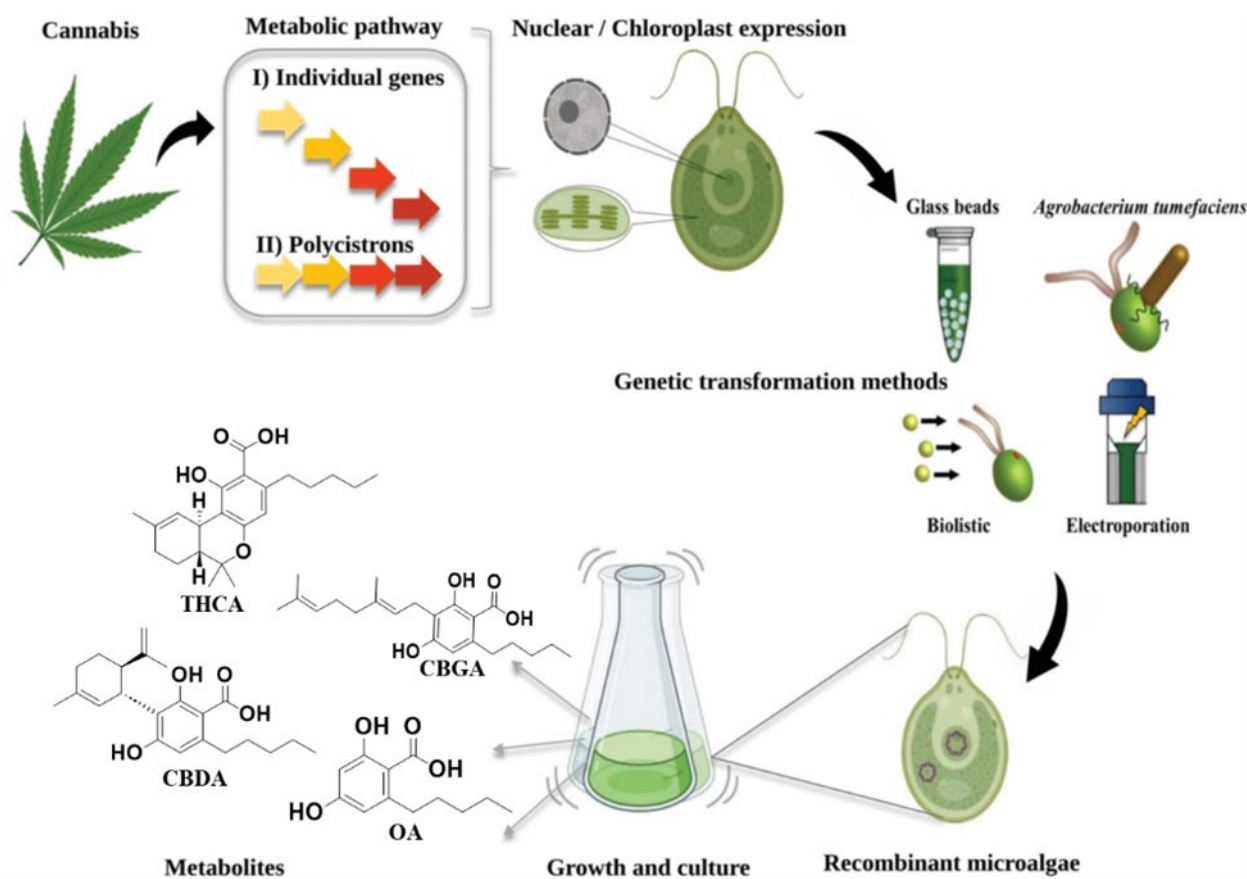


Figure 1. 7. Stratégies de production des CBs chez *C. reinhardtii*.

Représentation schématique de l'hypothèse de l'approche biotechnologique d'exploitation de *C. reinhardtii* pour la production hétérologue des CBs. Figure adaptée à partir de celle publiée par Bolaños-Martínez et al. (Bolaños-Martínez et al., 2022).

Dans cette étude nous nous focaliserons principalement sur l'investigation du système d'expression nucléaire de *C. reinhardtii* pour la production hétérologue des CBs.

I. 3. Objectifs du projet

Dans ce projet de thèse, notre objectif général est d'évaluer la possibilité de l'exploitation de *C. reinhardtii* comme une plateforme potentielle de la biosynthèse *de novo* des CBs à la suite de l'intégration dans son génome nucléaire, des gènes impliqués dans les deux dernières étapes de la voie biosynthétique naturelle responsables de la production de CBGA et de CBDA, notamment le gène *NphB* (pour remplacer le gène APT transmembranaire) et le gène *CBDAS*.

En tenant compte du phénomène d'intégration aléatoire des transgènes dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii* qui mène à l'obtention d'un nombre élevé des transformants avec des niveaux

d'expression variable, et parfois des transformants résistants sur les milieux de sélection sans nécessairement contenir le gène d'intérêt, il sera question pour nous de façon plus spécifique dans cette étude, de :

- 1- Développer une méthode efficace de sélection et d'identification rapide des microalgues génétiquement transformées qui contiennent le gène d'intérêt.
- 2- De transformer le génome nucléaire de *C. reinhardtii* avec les gènes *NphB* et *CBDAS*, et caractériser les transformants ayant intégré les gènes d'intérêt pour leur capacité d'expression des transgènes ainsi que de production des protéines fonctionnelles correspondantes.

II. CHAPITRE 2: Rapid and efficient colony-PCR for high throughput screening of genetically transformed *Chlamydomonas reinhardtii*

Serge Basile Nouemssi, Manel Ghribi, Rémy Beauchemin, Fatma Meddeb-Mouelhi, Hugo Germain et Isabel Desgagné-Penix

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *MDPI Life*, 2020.

Les informations et les détails en lien avec les figures et tableaux supplémentaires du chapitre II se trouvent en Annexe A

Contribution des auteurs

S.B.N., M.G., F.M., H.G. et I.D.-P ont conçu le projet; **S.B.N., M.G., R.B. et F.M** ont monté et validé la méthodologie; **S.B.N. et M.G.** ont réalisé les expériences et les analyses des résultats; **S.B.N., M.G., et F.M** ont planifié et écrit le manuscrit original; **S.B.N., M.G., R.B. et F.M** ont révisé et corrigé le manuscrit; **H.G. et I.D.-P** ont supervisé le travail; **I.D.-P** a financé le projet.

Résumé de l'article en français

Les biotechnologies des microalgues se développent rapidement dans de nouveaux contextes commerciaux. Plusieurs produits à haute valeur ajoutée existent déjà sur le marché et le développement biotechnologique est axé sur le génie génétique des microalgues pour ouvrir de futures opportunités économiques pour la production alimentaire, de carburant et pharmacologique. La réaction en chaîne par polymérase sur colonies (colony-PCR ou cPCR) est une méthode essentielle pour le criblage de cellules de microalgues génétiquement transformées. Cependant, la capacité de cribler rapidement des milliers de transformants à l'aide de la méthode existante de PCR sur colonies devient un processus très laborieux et fastidieux. Dans cette étude, la transformation non homologue du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* via la méthode d'électroporation a générée plus de sept mille transformants. Afin de gérer efficacement ce nombre impressionnant de clones, nous avons développé une méthode de criblage par cPCR à haut

débit (HTS) pour maximiser la sélection et la détection de clones positivement transformés. Pour cela, nous avons optimisé la disposition des cellules transformées de *Chlamydomonas* suivant le modèle d'une plaque de 96 puits, sur les milieux de culture pour améliorer l'extraction de l'ADN génomique et la cPCR dans une plaque à 96 puits. L'application de cette méthode HTS cPCR optimisée offre une méthode rapide, moins coûteuse et fiable pour la détection et la sélection des transformants de microalgues. Notre méthode, qui permet d'économiser jusqu'à 80 % du temps expérimental, est prometteuse pour l'évaluation des cellules génétiquement transformées et la sélection pour des applications biotechnologiques basées sur les microalgues telles que la biologie synthétique et l'ingénierie métabolique.

Article complet en Anglais:

Rapid and efficient colony-PCR for high throughput screening of genetically transformed *Chlamydomonas reinhardtii*

Serge Basile Nouemssi ¹, Manel Ghribi ¹, Rémy Beauchemin ¹, Fatma Meddeb-Mouelhi ^{1,2}, Hugo Germain ^{1,2} and Isabel Desgagné-Penix ^{1,2*}

¹ Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7; serge.nouemssi@uqtr.ca (S.B.N.); Manel.Ghribi@uqtr.ca (M.G.); Remy.Beauchemin@uqtr.ca (R.B.); Fatma.Meddeb@uqtr.ca (F.M.); Hugo.Germain@uqtr.ca (H.G.)

² Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

* Correspondence: Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca

Received: 21 July 2020; Accepted: 8 September 2020; Published: 10 September 2020

Abstract:

Microalgae biotechnologies are rapidly developing into new commercial settings. Several high-value products already exist on the market, and biotechnological development is focused on the genetic engineering of microalgae to open up future economic opportunities for food, fuel, and pharmacological production. Colony-polymerase chain reaction (colony-PCR or cPCR) is a critical method for screening genetically transformed microalgae cells. However, the ability to rapidly screen thousands of transformants using the current colony-PCR method becomes a very laborious and time-consuming process. Herein, the non-homologous transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* using the electroporation and glass beads methods generated more than seven thousand transformants. In order to manage this impressive number of clones efficiently, we developed a high-throughput screening (HTS) cPCR method to maximize the detection and selection of positively transformed clones rapidly. For this, we optimized the

Chlamydomonas transformed cell layout on the culture media to improve genomic DNA extraction and cPCR in a 96-well plate. The application of this optimized HTS cPCR method offers a rapid, less expensive, and reliable method for the detection and selection of microalgae transformants. Our method, which saves up to 80% of the experimental time, holds promise for evaluating genetically transformed cells and selection for microalgae-based biotechnological applications such as synthetic biology and metabolic engineering.

Keywords: High-throughput screening; microalgae; colony-PCR method; genetic transformation; *Chlamydomonas reinhardtii*; synthetic biology

II. 1. Introduction

Chlamydomonas reinhardtii is a common single-celled photosynthetic microalga, populating fresh water and moist soil. It is also known for easy isolation, cultivation, and transformation (Malcata et al., 2018; Salomé et Merchant, 2019). This unicellular eukaryotic green microalga strain has a well-characterized genome (Merchant et al., 2007), and it has been commonly used to study a number of biological processes, which makes it a model organism for biotechnological studies. *C. reinhardtii* has been widely used in basic and applied sciences and it is considered an ideal host and cell-factory for the production of high-added value bioproducts (Kong et al., 2019; Scaife et al., 2015; Scranton et al., 2015). In addition, because of its rapid growth and high biomass production at low cost, *C. reinhardtii* has attracted the interest of several biotechnologists. Nevertheless, the transformation and selection remain the decisive stages in using *C. reinhardtii* microalgae as a biotechnological platform (León-Bañares et al., 2004). Several genetic transformation methods have been established to introduce foreign DNA fragments into the *C. reinhardtii* including electroporation, glass beads, silicon carbide whiskers, microparticle bombardment and Agrobacterium-mediated transformation (Kindle, 1990; Kumar et al., 2004; Leon et Fernandez, 2007; Shimogawara et al., 1998). However, the integration of exogenous DNA into the nuclear genome predominantly occurs randomly *via* Non-Homologous-End-Joining (NHEJ), leading to a large and heterogeneous population of transformed cells (tens of thousands) with varied expression levels. Moreover, the integrated foreign genes or cassettes may be subjected to deletions, genomic

rearrangements and insertion of short DNA fragment (Jinkerson et Jonikas, 2015; Zhang et al., 2014) in addition to the epigenetic silencing phenomenon that decrease or suppress the expression of the transgenes. Such events require a meticulous high throughput screening (HTS) technique to handle the high number of the genetically transformed cells with desirable expression level (Leon et Fernandez, 2007; Nour-Eldin et al., 2018; Shahar et al., 2020; Weiner et al., 2018; Yamano et al., 2013).

The traditional method of initial screening of microalgae transformants is based on selectable markers such as antibiotic resistance and fluorescence, that are commonly used or a combination of bicistronic mRNA construct that allow expression of a GOI and a selectable marker (Baier et al., 2018; Kong et al., 2015; Lauersen et al., 2016; Lauersen et al., 2013a; Lauersen et al., 2015; León-Bañares et al., 2004; López-Paz et al., 2017; Molino et al., 2018; Mussnug, 2017; Onishi et Pringle, 2016; Plucinak et al., 2015; Rasala et al., 2012; Rasala et Mayfield, 2015; Wichmann et al., 2018). However, the screening method base on antibiotic resistance approach remains limited due to its large number of false positives. On other hand, fluorescence reporter screening has been used in several studies and demonstrated high potential in order to select positively transformed microalgae based on their fluorescence emission (Baier et al., 2018; Lauersen et al., 2016; Lauersen et al., 2015; López-Paz et al., 2017; Molino et al., 2018). This method seems, however, inconvenient for laboratories indisposed of the fluorescent agar plate reader. Additionally, strains with low fluorescence could not be easily detected. An additional screening method, named colony polymerase chain reaction (cPCR) is used to select antibiotic-resistant transformants that harbor copies of the integrated expression cassettes (Cao et al., 2009). Although DNA purification is still used, the Chelex method seems to be way easier and faster. cPCR using Chelex for DNA extraction is a powerful technique that bypasses DNA purification (Cao et al., 2009). This method relies on the selectivity of PCR amplification to determine whether a microorganism of interest integrates the target inserted DNA. For bacteria and yeast, simply adding a small portion of cell colony directly to a PCR master mix will introduce enough template DNA for amplification (Sheu et al., 2000). cPCR is challenging with microalgae because of their complex cell wall structure that precludes efficient extraction of their genetic material leading to a more laborious and time-consuming PCR especially when the number of transformants to be screened is large.

Another challenging issue is to maintain thousands of clones by subculturing and managing them using single Eppendorf and PCR tubes for the processing of transformants by cPCR. Hence, the need to develop an optimized high throughput screening (HTS) cPCR method to maximize the detection and selection of hundreds or even thousands of positive transformed clones rapidly becomes an urgent requirement. Therefore, the efficiency is critical: every improvement in workflow efficiency leads to significant savings in time. Eliminating pipetting steps reduces the potential for contamination and error, and minimizes repetitive strain-induced injury. Simplifying the screening procedure also enables better standardization between different laboratory personnel, which can be crucial for screening a huge number of transformants.

Here, we report a rapid and an optimized method for handling high number of *C. reinhardtii* transformants with embedded foreign genes or cassettes in the genomic DNA. We describe details (steps and time savings) of this rapid and specific molecular technique and high-throughput (HT) PCR samples loading onto agarose gel for electrophoresis and the analysis of a high number of genetically transformed microalgae. The effectiveness of the proposed procedure, 96-well plate PCR (named here, HT), was compared with single tubes PCR (named here, standard (ST)) screening.

II. 2. Materials and Methods

2. 1. *C. reinhardtii* strain, plasmid and primers design

C. reinhardtii strain C-137 wild type (wt) and the pOptimized_mRuby2_Hygromycin (pOpt_mRuby2_Hyg) (Lauersen et al., 2015) cloning vector were purchased from the Chlamydomonas Resource Center (Minneapolis, MN, USA) (Center). Recombinant plasmid construct, pOpt_mRuby2_Hyg containing gene of interest (GOI) (Appendix A, Figure A1) was made using Gibson assembly strategy. Transformed *E. coli* DH5 alpha cells, bearing the pOpt_mRuby2_Hyg-GOI expression, were selected on LB-agar with 100 µg/mL Ampicillin. Plasmid DNA was isolated using a Biobasic plasmid extraction kit (Cat no# BS614). Plasmid DNA was then used to ascertain the integrity of the nucleotide sequence by next gene sequencing (at MGH CCIB DNA CORE). The nuclear phosphoglycerate kinase (PGK), a housekeeping gene (Liu et al., 2012) (GeneBank ID: AF244144.1), is used as positive PCR control. The oligonucleotide primers used in this

study were synthesized by Integrated DNA Technologies (San Diego, CA, USA) (Technologies). The following primers were used to amplify nuclear (Nuc) PGK and GOI genes to obtain PCR product of 944 and 506 bp, respectively:

Nuc_PGK_F: 5'AGTCCGAACAACCCACTTAC 3';

Nuc_PGK_R: 5' CAGAGCTCAGGAGGTGAAATAG 3';

GOI_F: 5' GCTGGGCATCAAGAAGACCG 3';

GOI_R: 5' CCTGCGTGTAGTTGTTCGGG 3.'

2. 2. *C. reinhardtii* growth and transformation conditions

Unless otherwise stated, cells were cultivated mixotrophically at 25°C in Tris-acetate phosphate (TAP) medium under moderate and continuous white fluorescent light at the intensity of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in shake flasks or on agar plates with relative humidity (Rh) of 50%.

Herein, electroporation method was performed for transformation as described in (Shimogawara et al., 1998; Wang et al., 2019; Wittkopp, 2018) with slight modification. *C. reinhardtii* cells were transformed using the Bio-Rad Genepulser XcellTM electroporation machine and 4 mm cuvette under the following parameters: voltage 0.5 kV; capacitance 50 μF ; resistance 800 Ω .

Briefly, liquid state cells were grown in 30 mL TAP culture medium in a 125 mL Erlenmeyer flask with an initial Optical Density at 750 nm ($\text{OD}_{750\text{nm}}$) of 0.1 (1×10^5 cells/mL) with gentle shaking (100 rpm) to a final $\text{OD}_{750\text{nm}}$ of 0.7 (7×10^6 cells/mL). Cells were harvested by centrifugation at 7000 x g for 5 min and then washed three times by resuspending the pellet in 5 mL of Max EfficiencyTM Transformation Reagent for Algae (Invitrogen Cat no# A24229) and centrifuged in the same conditions as in the harvesting step. The sample were incubated on ice for 10 min prior to electroporation which was performed by applying an electric pulse using 250 μL of *C. reinhardtii* cells and 500 ng of linearized purified plasmid. Transgenic strains were resuspended in 5 mL of TAP liquid medium supplemented with 40 mM sucrose (TAP/sucrose) and then incubated at 25°C with gentle shaking (100 rpm) for 22 h under continuous light. After incubation, the transformed cells were harvested by centrifugation at 7000 x g for 5 min and resuspended in 250 μL of Max Efficiency. Then, spread on TAP agar media supplemented with Hygromycin (10 $\mu\text{g/mL}$) and incubated in a growth chamber for around 5 to 7 days.

When single clones appeared on agar Petri dish, total number of transformants on each plate was counted using OpenCFU software (Geissmann, 2013) to determine transformation efficiency.

2. 3. Strains layout and selection method

Hygromycin-resistant isolated transformants were selected randomly and colonies were sub-cultured on TAP agar plate media supplemented with Hygromycin (Hyg) freshly prepared to verify and ensure their growth stability.

In order to achieve a high throughput screening by cPCR, we have optimized the layout of the clones on the culture media according to the model of a 96-well plate which constitutes the template used for this work as shown in figure 1. The current approach allows to randomly select the maximum number of clones and to easily maintain them by successive sub-culturing on TAP media supplemented with Hygromycin (Hyg).

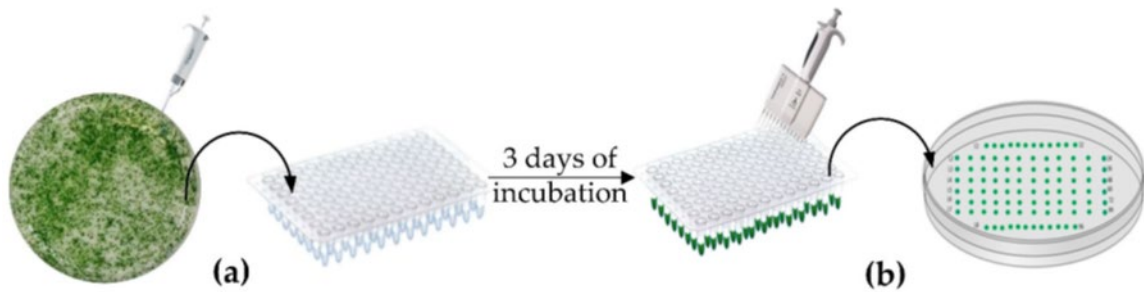


Figure 2. 1. First round of selection and maintenance of transformants.

(a) Selection of isolated transformants from TAP agar plate using 10 µL tips after 7 days of incubation and inoculation in liquid media in 96-well plate, (b) Sub-culturing and maintaining of selected clones according to the model template of the 96-well plate.

The first selection step was done by picking-up the isolated clones from the transformed *C. reinhardtii* cells using sterile micropipette tips and resuspending them in 200 µL of TAP containing 10 µg/mL of Hyg liquid medium initially distributed in a cover sterile 96-well plate (Thermofisher Cat no# 655180) (Figure 1 a). Cells in suspension were incubated in the growth chamber under gentle shaking for 3 days. After incubation, 2 µL of the suspended cells were withdrawn using a 12-multi-channel micropipette and added, in the same schema as in the 96-well plate, to TAP agar media containing 10 µg/mL of Hyg prepared in a large Petri dish (150 mm x 15 mm) (Fisher Scientific Cat no# 249964) (Figure 1 b) and incubated for 7 days at 25°C under same conditions described in section

2.2. The selected clones were maintained by several round of subculturing using the same approach as described previously with a 12-multi-channels micropipette every 3 to 4 weeks. Multiple rounds of screening on antibiotic help to eliminate false positive and verify the stability of the transgene over time.

2. 4. High throughput genomic DNA extraction

Genomic DNA extraction was done according to the protocol described by Cao et al. (Cao et al., 2009) with slight modifications. For a better handling of the high number of clones obtained after the transformation and subculture of hygromycin-resistant colonies, we developed a high-throughput DNA extraction procedure. For this, we used the big Petri dishes (150 mm x 15 mm) (Fisher Scientific Cat no# 249964, Waltham, MA, USA) containing 96 recombinant colonies, laid out for 96-well plate (as shown in Figure 1) and for a 12 multi-channels micropipette (P200). This technique helps to save time by extracting genomic DNA from 96 different clones at the same time (counting the untransformed wild type as a negative control) (Figure 2).

First, 5 mL of 5% Chelex-100 solution was prepared as described by (Cao et al., 2009) and a volume of 50 μ L was dispensed, as shown in Figure 2a, in each well of PCR 96 well plate using 12-multi-channels micropipette (or dispensing pipette). Then, with the extremity of the 12-multi-channels micropipette's tips, cells were transferred by tip-touching the clones (around 1 mm in diameter) from the initial agar plate and resuspended in the first row of the 96-well plate containing 50 μ L of 5% Chelex-100 as described in Figure 2b. This step is repeated for each row (i.e. 8 times from line A to line H of the 96-wells plate) following the order on the agar plate and then close the 96-wells plate with an appropriate seal (Thermofisher Scientific Cat no# AB-0558). The mixture was vigorously vortexed for 10 sec and incubated at 95°C (in the PCR thermocycler) for 10 min (Figure 2c). After incubation, the plate was cool down on ice for 1 min and vortexed again for 10 sec. Finally, the 96-wells plate containing the extracted DNA was centrifugated at 3500 x g for 5 min at room temperature using a 96-wells plate centrifuge as described in Figure 2c. A volume of 2 μ L of supernatant of each well was used as DNA samples for PCR reaction (final volume of 25 μ L). The concentration of the extracted genomic DNA of the different *C. reinhardtii* transformants were measured using a plate reader (Biotek

synergy^{H1} microplate reader) at OD_{260nm} (Appendix A, Table A1) and DNA samples were stored at -20°C for further use.

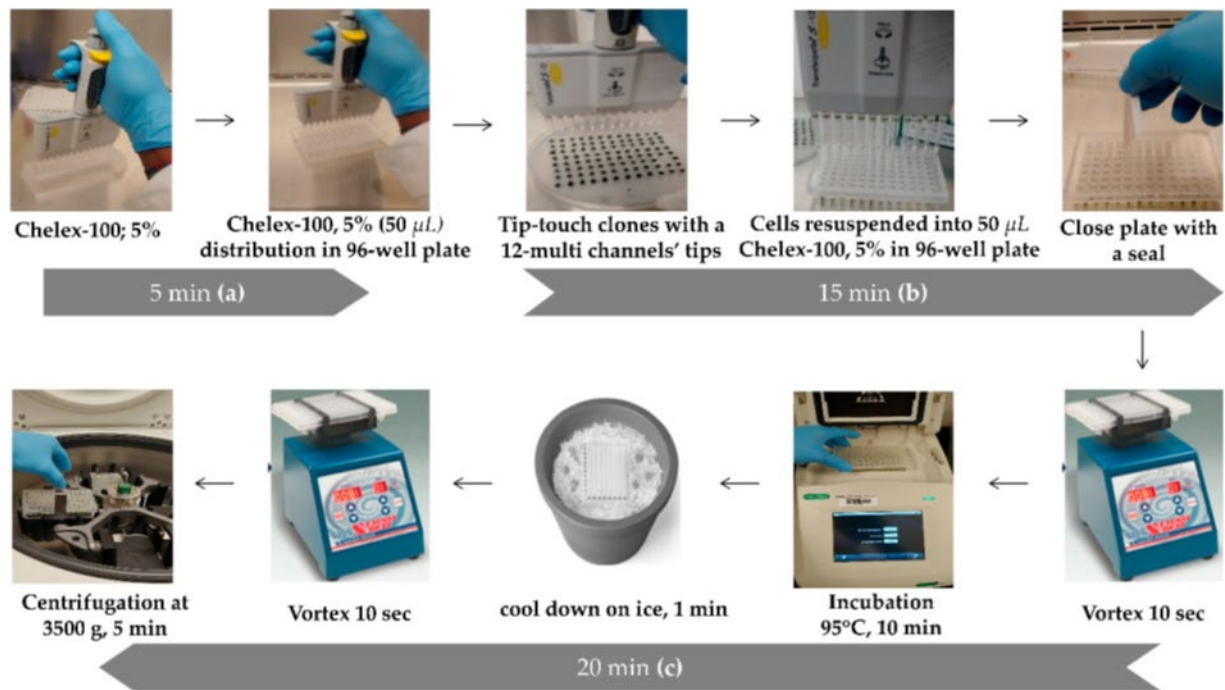


Figure 2. 2. High throughput DNA extraction and time correlation for each step.

The protocol is represented in 3 steps corresponding to the first 5 min (a), followed by the next 15 min (b) and onto the last 20 min (c).

2. 5. HT PCR and HT sample loading onto adapted agarose gel

The PCR reaction preparation has been performed using DNA Taq polymerase (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada, cat no# M0273) with the standard thermopol buffer. Reaction mix (25 µL/PCR), total volume required to assay 96 clones in the same PCR cycle (2.4 mL), was prepared according to NEB builder's protocol with slight modification (Appendix A, Table A2). Once prepared, the mix was poured into a sterile reservoir and a volume of 23 µL of reaction mix was aliquoted using a 12-multi-channels micropipette into a 96-wells PCR plate (Figure 3a) and 2 µL of DNA sample of different *C. reinhardtii* transformants were added into each well (Figure 3b). The plate was sealed (Thermofisher Scientific Cat no# AB-0558) to avoid evaporation and then placed into a thermocycler with a specific running cycle to amplify the GOI. The reaction conditions were 95 °C for 5 min, followed by 34 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at

54 °C for 30 s and extension 68 °C for 1 min. The last step of the reaction was a final elongation at 68 °C for 5 min and stored at 4 °C.

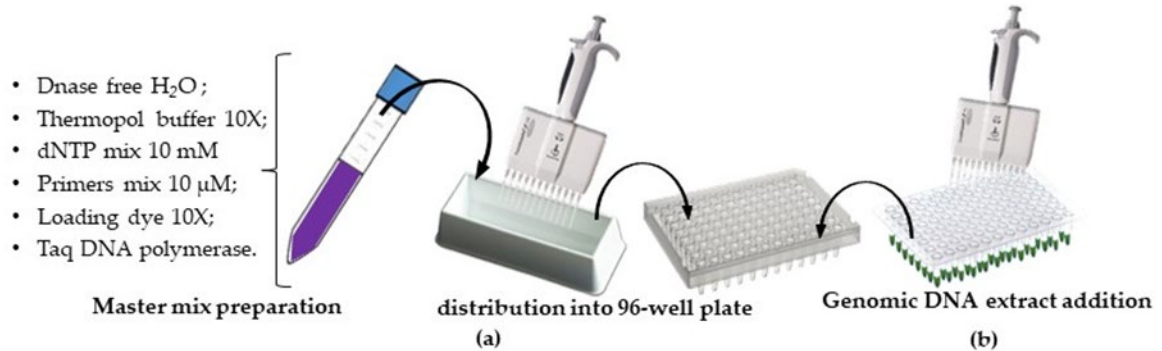


Figure 2. 3. PCR reaction mix preparation and aliquoting.

(a) master mix reaction preparation and distribution into 96-well plate; (b) DNA sample addition in the PCR reaction mix.

In order to be able to easily load all the amplification products on an agarose gel, two large electrophoretic tanks containing an adapted 52 wells comb were used. The loading dye buffer 10X was prepared with bromophenol blue and glycerol as described by Le Gouill & al., (Le Gouill et Dery, 1991) with slight modifications. It was initially added directly into the PCR reaction mix (as shown in Figure 3) before the amplification step so that the PCR amplified samples were loaded directly onto the 1% agarose gel using a 12-multi-channels micropipette.

This experimental step allowed us either to highlight and confirm the HTS genomic DNA (gDNA) extraction protocol by amplifying a 944 bp fragment of the genomic DNA of *Chlamydomonas* that is specific to the PGK gene (as reference gene and positive control of the genomic DNA extraction), or to select the positives clones during the screening experiment by HTS-cPCR. Both primers pairs (for PGK and GOI) were used in the same PCR reaction. Positives transformants were identified by amplifying a 506 bp fragment of the gene of interest GOI. This method allows to screen rapidly and select a high number of genetically transformed *C. reinhardtii* microalgae.

II. 3. Results

3. 1. Strains layout and HTS DNA extraction

A high transformation efficiency of up to 1×10^6 CFU/μg of linear plasmid DNA was obtained using the electroporation method. After 5 to 7 days of incubation on TAP agar

plate supplemented with 10 µg/mL of hygromycin, we obtained more than 7000 *C. reinhardtii* transformants (Figure 4A). A total of 1440 transformants were selected randomly and cultured according to the layout on TAP agar following a 96-well plate model (Figure 4b). The use of 96 wells formats template is modern state of art for different *Chlamydomonas* laboratories and it facilitate a better management of high numbers of clones. This layout of transformants on the TAP agar media allows for the rapid round culturing of the clones and for the easy pick-up of colonies for the high throughput genomic DNA extraction.

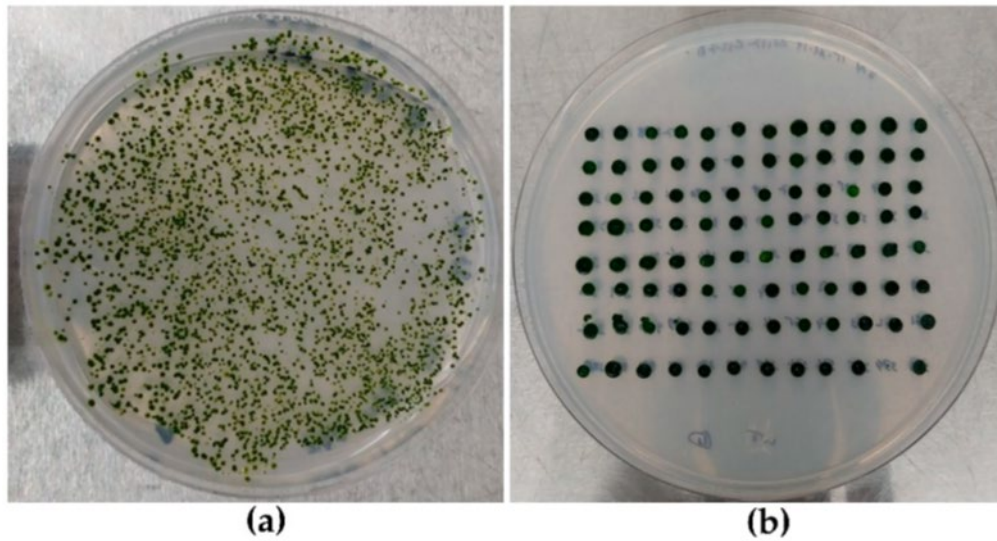


Figure 2. 4. Antibiotic selective TAP agar plate containing genetically transformed *C. reinhardtii*.

(a) Colonies obtained after 7 days incubation of genetically transformed cells; (b) transformants layout as 96-well plate on culture medium.

After the high throughput extraction, the genomic DNA concentration was measured using the Take 3 plate into the plate reader (Biotek synergy^{H1} microplate reader) (Appendix A, Table A1). This assay was performed to ensure that the DNA concentration obtained following our high throughput DNA extraction was relatively uniform across all colony tested and within each cPCR reaction and that the DNA quality was good (Song et al., 2013).

The range of DNA concentration of the transformants was between 21 to 317 ng/µL and showed high purity according to the OD ratio 260/280 nm (Appendix A, Table A1) (Chen et al., 2019). Genomic DNA extraction can also be performed from liquid cell

cultures from 96-wells plate after 3 days incubation in selective media (Figure 1a) for cPCR amplification (data not shown).

3. 2. High-throughput screening cPCR and revelation

Genomic DNA samples from 1440 transgenic *C. reinhardtii* and wild type were extracted using HTS extraction method as described in the materials and methods section. Nuclear PGK gene was used as reference to check the quality, reliability, and specificity of extracted genomic DNA. A fragment of 944 bp of the PGK gene was amplified to provide an example from 48 *C. reinhardtii* transformed and untransformed (named here wt) clones (Figure 5). The result showed the efficiency of HT genomic DNA extraction and HT amplification method. Forty-eight positives' amplicons of PGK gene were obtained out of 48 cPCR. Thus, the specific high throughput screening and selection of mutants positively transformed becomes easier using the specific primers in the same reactional mix for the amplification of the gene of interest in the same genomic DNA samples. In addition, DNA extracted sample can be used for PCR amplification after storage at -20 °C.

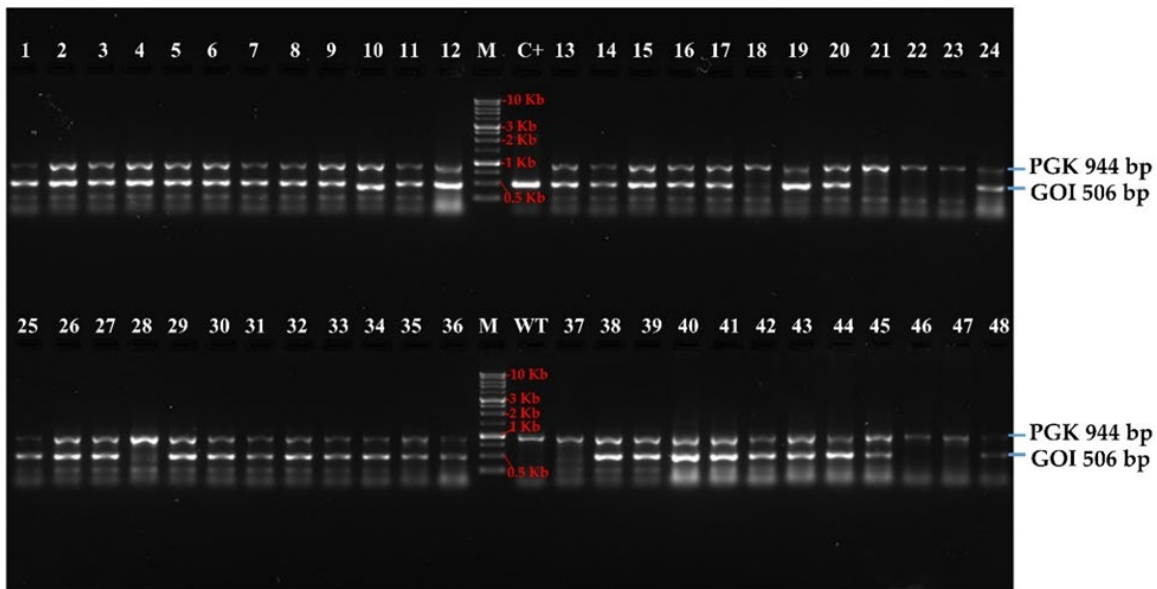


Figure 2. 5. Example of stained SYBR safe agarose gel (1%) showed amplicon of 48 samples.

(PGK) 48 nuclear phosphoglycerate kinase (PGK) gene PCR amplification at 944 bp; (GOI) 48 gene of interest (GOI) PCR amplification at 506 bp. PCR samples were migrated at 100 volt/cm for 60 min. Colony numbers are shown on top of the wells M: 1kb DNA ladder, Froggabio Cat. DM010-R500; wt: wild type (untransformed *C. reinhardtii*) extracted using

the same standard protocol as the transformed clones; C+: positive control is plasmid construct (pOpt_mRuby_Hyg-GOI).

In the same order, the amplification of a fragment of 506 bp related to the GOI from 48 transformed clones showed 40 positive clones (**Figure 2. 5**). The number of PCR-positive transformants/number of transformants analyzed ratio is 646/1336. Thus, the percentage of positive colonies is 48.3 % (**Table 2. 1**).

Table 2. 1. Number of transgenes selected by the high-throughput screening (HTS) method.

Number of colonies counted after electroporation	Number of clones selected randomly	Viable clones after six round sub-culturing (% of viable cells)	Positive clones after HTS-colony-PCR (% of positive colonies)
7000	1440	1336 (93)	646 (48,3)

By using this HTS-screening method, we were able to obtain 646 positive transformants over 1336 viable transformants selected after transformation (**Table 2. 1**).

II. 4. Discussion

According to Cao & al., (Cao et al., 2009), colony-PCR (or cPCR) is known as a highly efficient method of genetic detection. This standard gold technique also has diverse advantages for the screening and selection of genetically transformed cells. Regarding microalgae transformation, this method is shown to be efficient and more specific for the screening and selection of positives transgenes in several genetically transformed green algae such as *C. reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* to name a few (Azevedo et al., 2017; Lai et al., 2019; Run et al., 2016; Vijayaraman et al., 2016; Walch et al., 2016).

The transformation of *C. reinhardtii* using the electroporation method led to a high number of transformants with a transformation efficiency of 1×10^6 CFU/ μ g of linear plasmid DNA (Wang et al., 2019). Because of the random integration of transgene into the *C. reinhardtii* nuclear genome, the fact that transformants can grow on TAP agar supplemented with hygromycin does not necessarily imply that the clones also integrated

the gene of interest. Thus, it is very important to screen a high number of clones to increase the chances of selecting transformants which could have integrated one or multiple copies of the exogenous gene of interest and feature high transgene expression (Nour-Eldin et al., 2018).

In order to tackle this issue, we optimized a high throughput screening (HTS) method based on our standard cPCR protocol. In this study, we showed that this HTS screening / selection method is easier, more practical and efficient to test and manage a high number of transformants either for cPCR assay, loading samples (onto agarose gel) or culture maintenance of transformants. Our developed method was compared to the standard screening (STS) method based on individual selection and maintenance, DNA extraction and PCR of transformants clone by clone. This HTS method is not only fast and efficient, but also less expensive and requires less working-time unlike the STS method, which is more laborious. In Table 2. 2, we present the working-time comparison determined between the STS method and HTS method on 96 clones by cPCR during this study. This comparison was done mainly for the principal steps of the experiment.

Table 2. 2. Working-time comparison between standard screening (STS; 96 colonies) and high throughput screening (HTS; 96 colonies) cPCR method.

	STS	HTS	Difference
Steps	Time (min)		
DNA extraction	360	40	320
Mix PCR preparation and distribution	150	35	115
Gel preparation and sample loading	150	20	130
Total	660	95	565

The standard cPCR method is clearly a highly time-consuming step when the number of clones tested is elevated to hundreds (for example 96 clones). The HTS-PCR is a 6X time-saving method which makes work less laborious and cheaper in terms of time, material or money. Moreover, using this method allowed us to avoid mistakes that can occur while working with single tube, and increase the reliability of the result as well as

positives clones selected. Indeed, the percentage of positive colonies obtained using HTS was 48.3 % compared to the 20 % using conventional screening. Besides all the advantages given by this method, it is important to note that the HTS-PCR is reflected positively in the ecological plan due to reduction of consumable and material used that could be a threat for the environment (such as single Eppendorf tubes and single PCR tubes to 96 wells plates i.e. less plastics). Finally, the layout template and the use of multi-channels pipets for culturing and maintaining the positive clones could be a useful technique for any genetic screening tool such as Southern blotting.

II. 5. Conclusion

In this work, we described the high throughput screening of *C. reinhardtii* genetically transformed cells and established a promising, reliable and rapid routine colony-PCR (cPCR) technique. This could help for easier and enhanced screening and selection of massive number of positive transformed cells, which could serve for academic and industrial uses. This technique also allows the manipulation of a high number of positively transformed cells accurately. In addition, more errors can be introduced from the standard technique which becomes very laborious and requires a lot of working-time when the number of clones to be tested becomes large.

In further studies, we aim to implement the HTS detection system for gene expression, based on the use of fluorescent proteins. We hope that this fast model HTS system could facilitate the first step of selecting the supposedly positive clones directly on agar plate before proceeding by any further analysis.

Author Contributions: Conceptualization, S.B.N., M.G., F.M., H.G. and I.D.-P.; Methodology, S.B.N., M.G., R.B. and F.M.; Validation, S.B.N., M.G., R.B. and F.M.; Formal analysis, S.B.N. and M.G.; Investigation, S.B.N. and M.G.; Writing—original draft preparation, S.B.N., M.G. and F.M.; Writing—review & editing, S.B.N., M.G., R.B., F.M., H.G. and I.D.-P.; Supervision, H.G. and I.D.-P.; Project administration, I.D.-P.; Funding acquisition, I.D.-P.

Funding: This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada—Collaborative Research and Development grant reference no

CRDPJ/530085-18 to IDP. Students (S.B.N. and R.B.) and postdoctoral fellow (M.G.) are supported by Mitacs—Acceleration program grants no IT12310 and IT13619 to IDP.

Acknowledgments: The authors wish to thank the industrial collaborator Mather Carscallen and Algae-C for sample and support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

II. 6. References

1. Malcata, F.X., I.S. Pinto, and A.C. Guedes, *Marine Macro-and Microalgae: An Overview*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018 2018.
2. Salomé, P.A. and S.S. Merchant, A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *The Plant Cell*, 2019. **31**(8): p. 1682-1707.
3. Merchant, S.S., et al., *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*. *Science*, 2007. **318**(5848): p. 245-250.
4. Scranton, M.A., et al., *Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production*. *The Plant Journal*, 2015. **82**(3): p. 523-531.
5. Scaife, M.A., et al., *Establishing Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host*. *The Plant Journal*, 2015. **82**(3): p. 532-546.
6. Kong, F., et al., *Molecular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 2019. **60**(6): p. 1184-1196.
7. León-Bañares, R., et al., *Transgenic microalgae as green cell-factories*. *TRENDS in Biotechnology*, 2004. **22**(1): p. 45-52.
8. Leon, R. and E. Fernandez, *Nuclear transformation of eukaryotic microalgae*, in *Transgenic microalgae as green cell factories*. 2007, Springer. p. 1-11.
9. Kindle, K.L., *High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(3): p. 1228-1232.
10. Shimogawara, K., et al., *High-efficiency transformation of Chlamydomonas reinhardtii by electroporation*. *Genetics*, 1998. **148**(4): p. 1821-1828.

11. Kumar, S.V., et al., *Genetic transformation of the green alga—Chlamydomonas reinhardtii by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 2004. **166**(3): p. 731-738.
12. Jinkerson, R.E. and M.C. Jonikas, *Molecular techniques to interrogate and edit the Chlamydomonas nuclear genome*. The Plant Journal, 2015. **82**(3): p. 393-412.
13. Zhang, R., et al., *High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA*. The Plant Cell, 2014. **26**(4): p. 1398-1409.
14. Nour-Eldin, H.H., et al., *High-throughput system for quantifying and characterizing homologous recombination in Chlamydomonas reinhardtii*. Algal research, 2018. **31**: p. 167-172.
15. Yamano, T., H. Iguchi, and H. Fukuzawa, *Rapid transformation of Chlamydomonas reinhardtii without cell-wall removal*. Journal of bioscience and bioengineering, 2013. **115**(6): p. 691-694.
16. Shahar, N., et al., *The Integration of Multiple Nuclear-Encoded Transgenes in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii Results in Higher Transcription Levels*. Frontiers in Plant Science, 2020. **10**(1784).
17. Weiner, I., et al., *Enhancing heterologous expression in Chlamydomonas reinhardtii by transcript sequence optimization*. The Plant Journal, 2018. **94**(1): p. 22-31.
18. Mussnug, J.H., *Nuclear Transformation and Toolbox Development*, in *Chlamydomonas: Molecular Genetics and Physiology*. 2017, Springer. p. 27-58.
19. Rasala, B.A., et al., *Robust expression and secretion of XylanaseI in Chlamydomonas reinhardtii by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide*. 2012.
20. Lauersen, K.J., et al., *Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of biotechnology, 2013. **167**(2): p. 101-110.
21. Lauersen, K.J., O. Kruse, and J.H. Mussnug, *Targeted expression of nuclear transgenes in Chlamydomonas reinhardtii with a versatile, modular vector toolkit*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(8): p. 3491-3503.

22. Kong, F., et al., *Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved Chlamydomonas strains*. Journal of bioscience and bioengineering, 2015. **120**(3): p. 239-245.
23. Plucinak, T.M., et al., *Improved and versatile viral 2 A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal, 2015. **82**(4): p. 717-729.
24. Onishi, M. and J.R. Pringle, *Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii*. G3 Genes|Genomes|Genetics, 2016. **6**(12): p. 4115-4125.
25. Molino, J.V.D., J.C.M. de Carvalho, and S.P. Mayfield, *Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: Expanding the secretion portfolio for Chlamydomonas reinhardtii*. PloS one, 2018. **13**(2): p. e0192433.
26. Lauersen, K.J., et al., *Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Metabolic engineering, 2016. **38**: p. 331-343.
27. López-Paz, C., et al., *Identification of Chlamydomonas reinhardtii endogenous genic flanking sequences for improved transgene expression*. The Plant Journal, 2017. **92**(6): p. 1232-1244.
28. Baier, T., et al., *Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Nucleic acids research, 2018. **46**(13): p. 6909-6919.
29. Wichmann, J., et al., *Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (E)- α -bisabolene from the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Metabolic engineering, 2018. **45**: p. 211-222.
30. Rasala, B.A. and S.P. Mayfield, *Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses*. Photosynthesis research, 2015. **123**: p. 227-239.
31. Cao, M., et al., *Chlamydomonas (chlorophyceae) colony PCR*. Protoplasma, 2009. **235**(1-4): p. 107-110.

32. Sheu, D.-S., Y.-T. Wang, and C.-Y. Lee, *Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR*. Microbiology, 2000. **146**(8): p. 2019-2025.
33. Chlamydomonas Ressource Center. Available online: <http://chlamycollection.org/> (accessed on 10 September 2020).
34. Liu, C., et al., *Validation of housekeeping genes for gene expression studies in an ice alga Chlamydomonas during freezing acclimation*. Extremophiles, 2012. **16**(3): p. 419-425.
35. Integrated DNA Techonologies. Available online: <https://www.idtdna.com/> (accessed on 10 September 2020).
36. Wittkopp, T.M., *Nuclear Transformation of Chlamydomonas reinhardtii by Electroporation*. BIO-PROTOCOL, 2018. **8**(9).
37. Wang, L., et al., *Rapid and high efficiency transformation of Chlamydomonas reinhardtii by square-wave electroporation*. Bioscience reports, 2019. **39**(1).
38. Geissmann, Q., *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. PloS one, 2013. **8**(2).
39. Le Gouill, C. and C. Dery, *A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids*. Nucleic acids research, 1991. **19**(23): p. 6655-6655.
40. Song, Y., et al., *A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards*. Springerplus, 2013. **2**: p. 1-7.
41. Chen, Y., et al., *An improved and reliable method for microalgae direct PCR*. Journal of Applied Phycology, 2019. **31**(4): p. 2411-2421.
42. Lai, M.-Y., N. Abdul-Majid, and Y.-L. Lau, *Identification of Host Proteins Interacting with Toxoplasma gondii SAG1 by Yeast Two-Hybrid Assay*. Acta parasitologica, 2019. **64**(3): p. 575-581.
43. Vijayaraman, R.S., V. Ramaraj, and A.J. Kindo, *Direct colony polymerase chain reaction for rapid identification of yeasts isolated from blood specimen*. Journal of The Academy of Clinical Microbiologists, 2016. **18**(2): p. 91.
44. Walch, G., et al., *Colony-PCR is a rapid method for DNA amplification of hyphomycetes*. Journal of Fungi, 2016. **2**(2): p. 12.

45. Azevedo, F., H. Pereira, and B. Johansson, *Colony PCR*, in *PCR*. 2017, Springer. p. 129-139.
46. Run, C., et al., *Stable nuclear transformation of the industrial alga Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research*, 2016. **17**: p. 196-201.
47. New England Biolabs Inc. Available online: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-thermopol-buffer-m0267> (accessed on 10 September 2020).

III. CHAPITRE 3: Heterologous expression of NphB and CBDAS in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals key barriers and opportunities for cannabinoid biosynthesis in microalgae

Le contenu de ce chapitre est sous forme d'article de recherche soumis qui est en révision dans la revue *Microbial Cell Factories*

Les informations et les détails en liens avec les figures et tableaux supplémentaires du chapitre III se trouvent en Annexe B

Serge Basile Nouemssi¹, Ayoub Bouhadada¹, Beauchemin Remy¹, Alexandre Custeau¹, Sarah-Ève Gelinas¹, Natacha Merindol¹, Fatma Meddeb-Mouelhi¹, Hugo Germain^{1,2}, and Isabel Desgagné-Penix^{1,2*}

¹Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boulevard des Forges, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada.

²Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada.

*Corresponding author

Highlights

- *Chlamydomonas reinhardtii* produces cannabigerolic acid (CBGA) *in vitro*
- Functional expression and accumulation of the prenyltransferase NphB in *C. reinhardtii*
- First report of active NphB production in *C. reinhardtii*
- Several factors beyond the promoter must be addressed to enable CBDAS accumulation in *C. reinhardtii*

Résumé de l'article en français

Au cours des dernières années, la demande de produits à base de cannabis et de cannabinoïdes (CBs) a augmenté en raison de leur légalisation croissante à des fins médicales et récréatives dans le monde entier. Actuellement, les CBs d'intérêt pharmaceutique sont principalement extraits et purifiés du cannabis, ce qui pose des défis en raison de la variabilité du rendement et de la pureté. Cependant, les chercheurs explorent des approches alternatives, telles que l'utilisation de micro-organismes comme plate-forme biotechnologique pour produire des CBs spécifiques et uniques. Cette étude vise à utiliser la microalgue verte modèle *Chlamydomonas reinhardtii* comme plate-forme durable pour synthétiser des CBs spécifiques. Pour ce faire, nous avons intégré dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, la version mutée du gène de l'aromatique prényltransférase soluble (*NphB*_{G286S/Y288A}) de la souche CL190 de *Streptomyces sp.*, et le gène de l'acide cannabidiolique synthase (*CBDAS*) par électroporation. Nous avons caractérisé des transformants stables pour l'intégration, l'expression, l'accumulation de protéines, l'activité enzymatique, et la production d'acide cannabigérolique (CBGA) et de l'acide cannabidiolique (CBDA). Nos résultats démontrent pour la première fois, la production d'une NphB active chez *C. reinhardtii*, produisant jusqu'à 633 ± 58 µg/L de CBGA *in vitro*. Cette étude ouvre la voie à l'établissement de cette microalgue comme plate-forme pour la biosynthèse de CBs tout en discutant des défis rencontrés dans l'expression de *NphB* et de *CBDAS* dans son génome nucléaire.

Contribution des auteurs

S. B.N. : Conceptualisation, Méthodologie, Investigation, Traitement de données, Analyse formelle, Rédaction manuscrit originale, Révision et modification. **A. B.** et **B. R.** : Conceptualisation, Méthodologie, Relecture et modification. **A. C.** : Analyse formelle, Validation. **S.-E. G.** : Analyse formelle, validation, Révision et modification. **N. M.** : Conceptualisation, Méthodologie, Traitement de données, Révision et modification. **F. M.-M.** : Conceptualisation, Méthodologie, Administration du projet, Supervision, Révision et modification. **H. G.** : Administration de projet, Ressources, Supervision, Révision et modification. **I. D.-P.** : Conceptualisation, Visualisation, Financement, Administration du projet, Ressources, Supervision, Révision et modification.

Abstract

Background: In recent years, there has been a growing demand for *Cannabis* products and cannabinoids (CBs) due to their expanding legalization for medical and recreational use. Currently, pharmaceutically relevant CBs are primarily extracted from *Cannabis*, a process that presents challenges related to yield variability and purity. To overcome these limitations, microbial platforms are being explored for the sustainable production of specific CBs. Compared to conventional microbial hosts such as *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, and *Saccharomyces cerevisiae*, the photosynthetic microalga *Chlamydomonas reinhardtii* offers advantages such as plant-like post-translational modifications, low-cost cultivation, carbon dioxide fixation, and low endotoxin contamination, making it a promising chassis for CB biosynthesis.

Results: We heterologously expressed a codon-optimized, soluble aromatic prenyltransferase (*NphB*_{G286S/Y288A}) from *Streptomyces* sp. strain CL190 and the *Cannabis sativa* cannabidiolic acid synthase (*CBDAS*) in the nuclear genome of *C. reinhardtii* by electroporation. Stable transformants were screened for genomic integration, gene expression, protein accumulation, enzymatic activity, and CB production. Our results demonstrate the successful expression of functional NphB in *C. reinhardtii*, with *in vitro* CBGA production reaching up to 633 ± 58 µg/L. In contrast, although *CBDAS* transcripts were detected under multiple construct designs, neither CBDAS protein nor CBDA was accumulated, indicating limitations in its expression, localization, or post-translational processing in *C. reinhardtii*.

Conclusions: Our study provides the first demonstration of *in vitro* CBGA biosynthesis in the photosynthetic model microalga *C. reinhardtii*, establishing it as a viable platform for CB production. It also highlights key challenges in nuclear expression of plant-derived enzymes, such as CBDAS, emphasizing the need for improved regulatory control, subcellular targeting, and mRNA processing to enable full pathway reconstruction in microalgae.

Keywords: Microalgae; biofactories; Cannabinoids; Synthetic biology; Aromatic prenyltransferase; Cannabidiolic acid synthase.

III. 1. Introduction

Cannabis sativa L. (Cs), a plant native to Central Asia with a long history of use, is renowned for its diverse phytochemical profile, particularly its phytocannabinoids (CBs). These specialized metabolites hold significant pharmaceutical and economic interest, including notable psychotropic activities (Andre et al., 2016; Gülck et al., 2020; Romero et al., 2020). CBs have been extensively studied in preclinical settings for treating various conditions, such as chemotherapy-induced nausea and vomiting, pain, multiple sclerosis-related spasticity, and neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease (Abd-Nikfarjam et al., 2023; Abrams, 2018; Al-Ghezi et al., 2019; Hazekamp et al., 2013; van den Hoogen et al., 2022).

With the increasing legalization of *Cannabis* and CBs for medical and recreational use, the global legal CB industry is projected to reach \$58 billion by 2028, with pharmaceutical CBs accounting for about one-third of total revenue (Dorbian, 2024). However, current CB production relies primarily on plant extraction, which poses challenges due to variable metabolite abundance and multiple CB analogs in plant extracts (Andre et al., 2016; Atakan, 2012; Gülck et Møller, 2020). While chemical synthesis offers an alternative, it remains environmentally unfriendly, inefficient, and limited by CBs' structural complexity (Dattatraya H. Dethe, 2015; Shultz et al., 2018).

To address these limitations, researchers have explored heterologous CB biosynthesis in alternative hosts, including insect cells, plants, and microbes (bacteria, yeast, and microalgae) (Awwad et al., 2023; Bolaños-Martínez et al., 2022; Fantino et al., 2024; Fantino et al., 2025; Gülck et al., 2020; Luo et al., 2019; Sene et al., 2025; Tan et al., 2018; Taura et al., 2007a; Zhang et al., 2023; Zirpel et al., 2017). This became feasible following the characterization of enzymes involved in CB biosynthesis (Gagne et al., 2012; Sirikantaramas et al., 2004; Sirikantaramas et al., 2005; Taura et al., 1996; Taura et al., 2007b). CB biosynthesis involves multiple interconnected steps across cellular compartments (**Figure 3. 1**). In *C. sativa*, cannabigerolic acid (CBGA), the central CB intermediate, is synthesized in the plastid by *C. sativa* prenyltransferase (*CsPT* or CBGA synthase), which prenylates olivetolic acid using geranyl diphosphate (GPP). CBGA is then converted in the apoplast by Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) or cannabidiolic acid synthase (CBDAS) to produce THCA and CBDA, respectively, the most

abundant CBs (Degenhardt et al., 2017; ElSohly et Gul, 2014; Gülck et al., 2020; Gülck et Møller, 2020; Hanuš et al., 2016; Hussain et al., 2021; Kearsey et al., 2020; Romero et al., 2020; Schmidt et al., 2024).

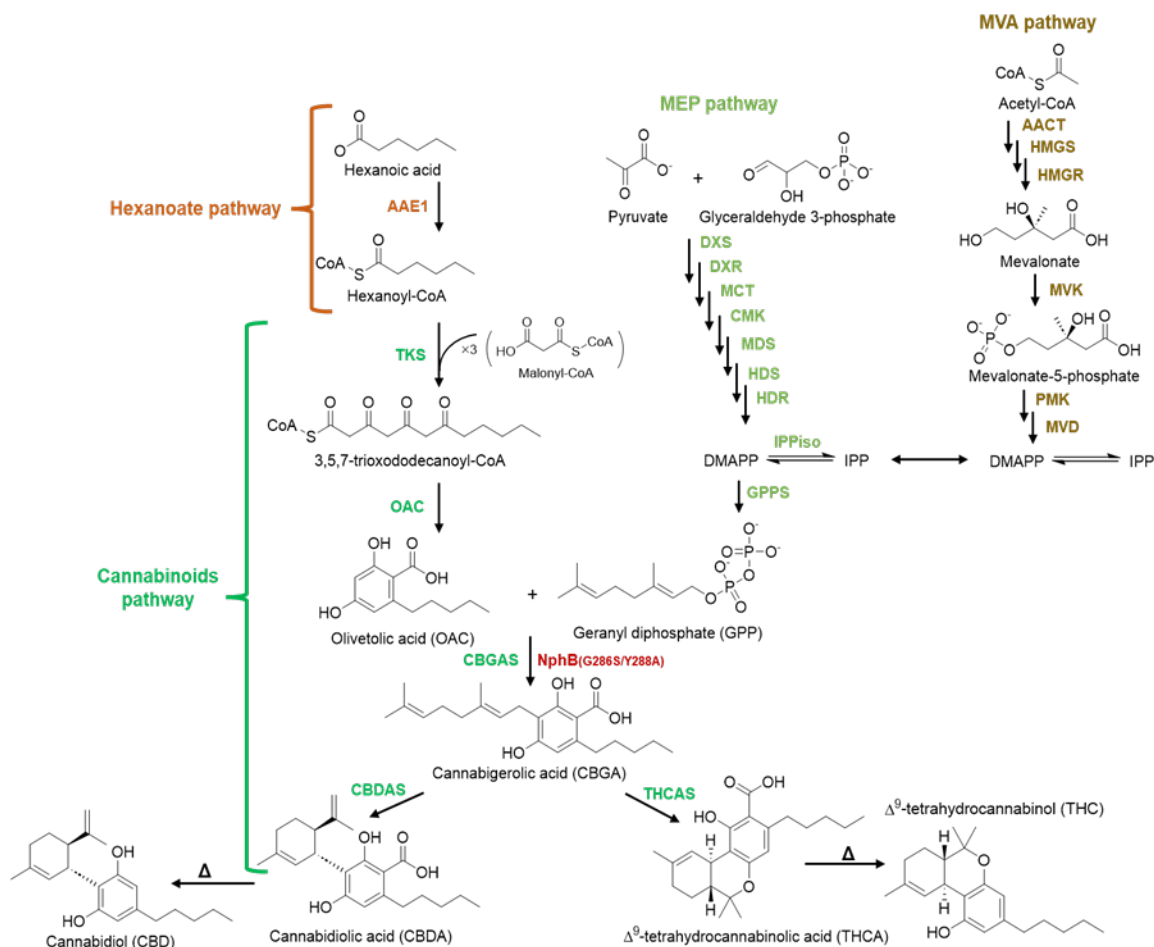


Figure 3. 1. Overview representation of the cannabinoid biosynthetic pathway.

Incorporating (in red) the double-mutated soluble aromatic prenyltransferase *NphB*_(G286S/Y288A) from *streptomyces sp.* strain CL190 to substitute the native *Cannabis sativa* cannabigerolic acid synthase (*CsCBGAS*). Highlighted in orange are enzymes involved in the Hexanoate pathway, the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway in light green, and the mevalonate (MVA) pathway in brown. The non-enzymatic decarboxylation of final cannabinoids CBDA and THCA is in black. Abbreviations: AAE1, Acyl activating enzyme 1; TKS, Type III tetraketide synthase; OAC, Olivetolic acid synthase; CBGAS, Cannabigerolic acid synthase; CBDAS, Cannabidiolic acid synthase; THCAS, Tetrahydrocannabinolic acid synthase; DXS, deoxyxylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MCT, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase; CMK, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MDS, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase; HDR, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, IPPiso, isopentenyl diphosphate

isomerase, GPPS, geranyl diphosphate synthase; AACT, acetoacetyl-CoA thiolase; HMGS, HMG-CoA synthase; HMGR, HMG-CoA reductase; MVK, mevalonate-5-kinase; PMK, phosphomevalonate kinase; MVD, mevalonate diphosphate decarboxylase; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl-diphosphate. We have adapted this representation from (Degenhardt et al., 2017; Gülck et Møller, 2020; Romero et al., 2020; Zirpel et al., 2017).

Heterologous expression of CBGA biosynthetic enzymes, such as CsPT1 and CsPT4, in yeast and *E. coli* has proven challenging due to their transmembrane plastidial localization, glycosylation requirements, misfolding, and improper compartmentalization (Ayakar et al., 2020; Carvalho et al., 2017; Krogh et al., 2001; Luo et al., 2019; Page et Boubakir, 2018; Zirpel et al., 2017). Therefore, the bacterial aromatic prenyltransferase NphB from *Streptomyces* sp. strain CL190 has been explored as an alternative CBGA synthase. While wild-type (WT) NphB exhibits low activity and substrate specificity, engineered variants have demonstrated enhanced catalytic efficiency (Bonitz et al., 2011; Kuzuyama et al., 2005; Lim et al., 2022; Qian et al., 2019). Notably, Valliere et al. identified the *NphB*_{G286S/Y288A} variant, which exhibited an over 100-fold increase in CBGA synthesis, making it a strong candidate for heterologous CB production (Valliere et al., 2019).

Among microbial hosts, the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* presents a promising platform for CB biosynthesis due to its well-characterized genome and closer evolutionary relationship to plants than yeast or bacteria (Merchant et al., 2007). This unicellular, photosynthetic organism has been widely used for biotechnology applications, including high-value metabolite production (Bolaños-Martínez et al., 2022; Einhaus et al., 2022; Kong et al., 2019; Schroda et Remacle, 2022). Although early studies faced challenges with transgene silencing (Schroda, 2019), advances in promoter design, intron incorporation, strain optimization, and chemical treatments have significantly improved heterologous gene expression (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Beauchemin et al., 2024; Gallaher et al., 2015; Schroda, 2019). Furthermore, *C. reinhardtii* has been successfully engineered to accumulate high titers of isoprenoids, a key CB precursor, without compromising native pigment levels or cell fitness (Einhaus et al., 2022; Lauersen et al., 2016; Lauersen et al., 2018; Zhao et al., 2022), supporting its potential for CB biosynthesis.

In this study, we establish *C. reinhardtii* as a heterologous host for CB biosynthesis by engineering it to express the *NphB*_{G286S/Y288A} variant (hereafter referred to as NphB) and

CBDAS. We assessed transgene integration, expression, enzymatic activity, and CBGA/CBDA production under different promoter configurations, genetic constructs, and strains.

We designed a bicistronic construct (C1), expressing *NphB* and *CBDAS* under the chimeric HSP70A-RBCS2 promoter (ARp), and two additional constructs: C2 (*NphB* alone under ARp) and C3 (*NphB* alone under the PSAD promoter (PSADp)) (**Figure 3. 3**). Three *C. reinhardtii* WT strains (CC-125, CC-1690, and CC-5415) were used. This is the first demonstration of functional NphB expression in *C. reinhardtii*, achieving CBGA titers of up to $633 \pm 58 \mu\text{g/L}$ *in vitro*. These findings underscore the potential of *C. reinhardtii* as a sustainable platform for CB production and provide insights into the challenges and opportunities of engineering this host for cannabinoid biosynthesis.

III. 2. Materials and Methods

2. 1. Cultivation conditions of microalgal and bacterial strains

Wild-type *C. reinhardtii* strains CC-125 (mt^+ , 137c), CC-1690 (mt^+ , Sager 21 gr), and CC-5415 (nit1 aggl1 mt^+ , Witman g1) were used in this study. Strains CC-125 and CC-1690 were obtained from the *Chlamydomonas* Resource Center (The University of Minnesota, USA), while strain CC-5415 was kindly provided by Prof. Martin Jonikas (Jonikas Lab, Princeton University, New Jersey). The microalgal strains were maintained under photo-mixotrophic conditions on Tris-acetate-phosphate (TAP) agar plates (Gorman et Levine, 1965; Harris et Harrisduke, 2009; Kropat et al., 2011) or in a liquid TAP medium. Liquid cultures were grown in 125 mL flasks on a rotary shaker (120 rpm) under white fluorescent light ($50\text{--}90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a 16 h light/8 h dark cycle at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

The bacterial strains *E. coli* DH5 α (Invitrogen) and *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific) were used to propagate plasmids, while *E. coli* Rosetta BL21 (DE3) pLysS (Novagen®) was used for recombinant protein expression. Bacteria were cultured in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with appropriate antibiotics (100 mg/L ampicillin, 35 mg/L chloramphenicol) at 37°C under shaking at 200 rpm for liquid culture.

2. 2. PCR amplification, cloning, and expression vector constructions

The plasmids pOpt_mRuby2_aphVII, containing the *aminoglycoside 3'-phosphotransferase* gene VII (*aphVII*) for hygromycin B resistance (Lauersen et al., 2015) and pSL18_aphVIII, carrying the *aminoglycoside 3'-phosphotransferase* gene VIII (*aphVIII*) for paromomycin resistance (Fischer et Rochaix, 2001), were obtained from the *Chlamydomonas* Resource Center. These plasmids were used as expression backbones for transgene integration into the *C. reinhardtii* nuclear genome. The plasmid pMAL-c2x (New England Biolabs) was used for the recombinant protein expression in *E. coli*.

The coding sequences of *NphB* (*NphB*_{G286S/Y288A}) (Valliere et al., 2019), extended Foot-and-Mouth Disease Virus 2A peptide (2A) (Plucinak et al., 2015), and *CBDAS* (Taura et al., 2007c) were codon-optimized for *C. reinhardtii* nuclear expression and synthesized (Bio Basic, Markham, Ontario, Canada).

Transgene insertion into the pOpt_mRuby2_aphVII vector backbone was performed using Gibson assembly with the NEBuilder® HiFi DNA Assembly kit (NEB), following the manufacturer's instructions. The required DNA fragments were amplified using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) and assembled under the control of the HSP70A-RBCS2 fusion promoter (ARp) and the RBCS2 terminator. This resulted in the recombinant expression vector pOpt_mRuby2_NphB-2A-CBDAS (**Figure S1A**), hereafter referred to as construction 1 (C1).

To generate the recombinant vectors pOpt_mRuby2-NphB (construction 2, C2; **Figure S1B**) and pOpt_mRuby2-CBDAS (Construction 4, C4; **Figure S1D**), the *NphB* and *CBDAS* coding sequences were amplified from C1 using primers specific to the vector backbone. The amplified fragments were gel-purified using the GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) and ligated using the NEB Kinase, Ligase, and *DpnI* (KLD) enzyme mix, following the manufacturer's protocol.

A restriction enzyme-based cloning strategy generated additional recombinant vectors: pSL18-NphB (construction 3, C3), pMAL-c2x-NphB, and pMAL-c2x-NphB-2A-CBDAS. For expression in *C. reinhardtii*, the NphB coding sequence was cloned into the pSL18 backbone under the control of the *PSAD* promoter and terminator (**Figure S1C**). The *NphB* gene was PCR-amplified from C1 using primers designed to introduce *NdeI/XbaI* restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively (**Table S1**). The PCR product was gel-

purified, digested with the corresponding restriction enzymes, and ligated into pre-digested pSL18 using T4 DNA ligase (NEB), following the manufacturer's protocol.

For expression in *E. coli*, the NphB and NphB-2A-CBDAS sequences were cloned into the pMAL-c2x vector under the control of the tac promoter (**Figure S2 A and B**). NphB was fused to the C-terminus of the maltose-binding protein (MBP) tag, while NphB-2A-CBDAS was inserted downstream of the lac operator, without an MBP fusion. The MBP tag enhances recombinant protein's expression, stability, and solubility and facilitates purification (Dälken et al., 2010; Duong-Ly et Gabelli, 2015). Coding sequences were amplified from C1 using primers incorporating *Bam*HI/*Hind*III sites (for MBP-NphB fusion) or *Nde*I/*Eco*RI (for NphB-2A-CBDAS). PCR products were gel-extracted, digested, purified, and ligated into the appropriately pre-digested pMAL-c2x vector using T4 DNA ligase (NEB).

Table S1 provides a complete list of primers, with introduced restriction sites indicated in bold and underlined.

2. 3. Transgene expression in the prokaryotic system, screening, and protein production

Recombinant expression vectors were transformed into chemically competent *E. coli* cells for plasmid propagation. *E. coli* TOP10 was used for C1 after Gibson assembly, while *E. coli* DH5 α was used for C2 and C3 following ligation-based cloning. Transformation was performed using the heat shock method according to the manufacturer's protocol. Transformed cells were plated on LB agar supplemented with 100 mg/L ampicillin and incubated at 37°C for 16 hours. To confirm successful plasmid integration, colony PCR was performed as described by (Azevedo et al., 2017). The reaction was carried out in a 25 μ L total volume using Taq DNA polymerase and ThermoPol buffer (NEB) under the following conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 sec, 54°C for 1 min, and 68°C for 1-3 min, with a final extension at 68°C for 5 min and an infinite hold at 4°C. The plasmids were verified via next-generation sequencing (NGS) at the Massachusetts Institute of Technology (MIT) to confirm sequence integrity.

For recombinant protein production, the purified pMAL-c2x-NphB and pMAL-c2x-NphB-2A-CBDAS vectors were extracted from *E. coli* DH5 α and transformed into chemically

competent *E. coli* Rosetta BL21 (DE3) pLysS using the heat shock transformation. Transformants were selected on LB agar plates containing 100 mg/L ampicillin and 35 mg/L chloramphenicol and incubated overnight at 37°C. A single PCR-positive colony was picked and grown overnight at 37°C in 12.5 mL LB broth containing antibiotics under shaking at 200 rpm. The overnight culture was inoculated into 250 mL fresh LB broth supplemented with antibiotics and grown at 37°C, 200 rpm, until the OD₆₀₀ reached 0.4–0.7. The cultures were then brought to room temperature before induction with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Induction was performed at 18°C for 20 hours with shaking at 150 rpm. Following induction, cells were harvested by centrifugation at 17,000 x g and resuspended in the protein solubilization buffer (25 mM Tris HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8). Protein extraction was performed by sonication using a Fisherbrand™ Model 505 Sonic Dismembrator (Thermo Fisher Scientific) under the following conditions: total sonication time 8 min; amplitude 41%, pulse on 14 sec; pulse off 35 sec. Cell lysates were centrifuged at 20,000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant containing the soluble protein fraction was collected and stored at -80°C for further analysis.

2. 4. Nuclear transformation and screening of the microalga *C. reinhardtii*

The nuclear transformation of *C. reinhardtii* was performed by electroporation, following the protocol described by (Beauchemin et al., 2024; Nouemssi et al., 2020), with slight modifications. A total of 2 µg of gel-purified vectors, linearized using *ScaI*, or a combination of *ScaI* and *KpnI*, was used to transform the microalgae. Electroporation was carried out using the Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ system in a 4 mm cuvette under the following conditions: 0.5 kV, 50 µF, 800 Ω.

Transformants were selected on TAP-agar plates supplemented with appropriate antibiotic (hygromycin, 15 mg/L or paromomycin, 15 mg/L) and incubated for 5–7 days until single colonies appeared. Colony enumeration was performed using Open CFU software (Geissmann, 2013). Randomly selected colonies were subcultured weekly on fresh TAP-agar plates containing antibiotics for five rounds to ensure stable genomic integration of the gene of interest. Subsequent screening was conducted using high-throughput colony PCR (HT-cPCR) as described by (Nouemssi et al., 2020).

For the co-expression of C2 and C4 as independent open reading frames (ORFs), both constructs, carrying the same selection marker, were co-transformed in a single procedure. Specifically, 1 µg of gel-purified linearized vector from each construct was combined in a 4 mm cuvette containing wild-type *C. reinhardtii* cells, followed by electroporation and screening under the abovementioned conditions.

To verify the integrity of the gene sequences following genomic integration, PCR products from HT-cPCR-confirmed transformants were analyzed by Sanger sequencing at the Centre de Recherche CHU de Québec, Université Laval.

2. 5. DNA extraction and colony PCR in *C. reinhardtii*

Genomic DNA (gDNA) extraction for HT cPCR was performed according to the described protocol in (Nouemssi et al., 2020). Two microliters of gDNA were used for colony PCR using Taq DNA Polymerase with ThermoPol® Buffer with PCR parameters: 5 min at 95°C for one cycle, 30 sec at 95°C, 1 min at 54°C, 1 to 3 min at 68°C for 30 cycles, 5 min at 68°C for one cycle, and final infinite hold at 4°C. Primer sequences used are listed in Supplementary **Table S1**.

Before the characterization of the PCR-positive clones for the expression of the transgenes, an alternative PCR of the gene of interest from extracted gDNA from the liquid culture was performed. The extraction of gDNA was done according to the protocol described by (Neupert et al., 2020) with slight modifications to assay the stability of the transgene in clones grown for five days in a 25 mL TAP medium. Briefly, 2 mL of algal cultures grown in liquid medium up to day five were centrifuged at 17000 x g for 1 min. The cell pellet was solubilized in 200 µL extraction buffer (2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, and 2% (v/v) freshly added β-mercaptoethanol) by vortexing, followed by the addition of 200 µL chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and incubation at 65°C for 20 min with shaking at 1400 rpm. After centrifugation at 17000 x g for 10 min at 10°C, the colorless DNA-containing supernatant was separated carefully by angling the tube at 45° (to avoid pipetting the organic phase) and transferred to a new microcentrifuge tube. The gDNA was precipitated by adding 0.7 volume of isopropanol to the supernatant and incubated at room temperature for 10 min, followed by centrifugation at 17000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was

washed with 1 mL 70% (v/v) ethanol, and the air-dried pellet was resuspended in 50 µL of DNase-free water supplemented with 1 µL RNase A (10 mg/mL) and then incubated for 15 min at 37°C. The yield and the quality of gDNA were determined by measuring the OD_{260/280} ratios using a NanoPhotometer® N60/N50 (Implen).

2. 6. Total RNA extraction and quantitative PCR

Total RNA was extracted from 5-day-old *C. reinhardtii* cultures using the TRIzol reagent (Invitrogen). A 4 mL culture was collected and centrifuged at 12,000 x g for 5 min, after which the cell pellet was resuspended in 500 µL of TRIzol. To enhance cell lysis, samples were flash-frozen in liquid nitrogen, incubated at room temperature for 10 min, and then extracted with 200 µL of chloroform. After centrifugation at 12,000 x g for 10 min at 4°C, the RNA-containing upper phase was carefully transferred to a fresh microcentrifuge tube. RNA was precipitated by adding 500 µL of isopropanol and 100 mM NaCl, incubating for 10 min at room temperature, and centrifuging at 12,000 × g for 10 min at 4°C. The RNA pellet was washed with 1 mL of 75% (v/v) ethanol, centrifuged at 7,500 x g for 5 min at 4°C, air-dried, and resuspended in 50 µL of nuclease-free water. Residual genomic DNA was removed using Turbo DNase (Invitrogen TURBO DNA-free Kit, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The RNA concentration and purity were assessed by measuring the OD_{260/280} ratio using a NanoPhotometer® N60/N50.

For quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), 250 ng of total RNA was subjected to reverse transcription and qPCR amplification in a single reaction using the Luna Universal One-step RT-qPCR Kit (NEB). Reverse transcription was performed at 55°C for 10 min, followed by an initial denaturation at 95°C for 1 min. qPCR cycling conditions included 45 cycles of 95°C for 10 sec (denaturation) and 60°C for 30 sec (extension). A melt curve analysis was conducted from 60°C to 95°C, with an increment of 0.5°C every 5 sec. Primers for *NphB* and *CBDAS* transcripts were designed using the PrimerQuest™ Tool (IDT), while reference gene primers (*histone 3* and *phosphoglycerate kinase [PGK]*) were obtained from (Beauchemin et al., 2024) (**Table S2**). SYBR Green fluorescence was recorded in the FAM channel of a CFX connect Real-Time System (Bio-Rad), and amplification products were analyzed using Bio-Rad CFX Manager version 3.1. Relative

transgene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak et Schmittgen, 2001). Each experiment was performed in two technical replicates per clone.

2. 7. Total protein extraction and western blot analysis

Total protein extraction was performed by sonication as described by (Fantino et al., 2024), with minor modifications. Briefly, *C. reinhardtii* culture (19 mL) grown for five days were harvested by centrifugation at 3,500 x g for 15 min at 4°C. the resulting cell pellets were resuspended in 500 µL of solubilization buffer (51.4 mM Tris-HCl pH 8; 0.75 mM sodium dodecyl sulfate [SDS]; 10 % (v/v) glycerol; 0.02 mM EDTA; 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]; and 2 µL of protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]) by gentle pipetting. Cells were lysed by sonication using a Fisherbrand™ Model 505 Sonic Dismembrator (Thermo Fisher Scientific) for six cycles of 3 min at 35% amplitude, with 30 sec pulses on and off. Lysates were centrifuged at 17,000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatants, containing the total soluble protein fraction, were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent western blot analysis and *in vitro* enzymatic assays. Protein concentrations were determined using the RC DC™ Protein Assay Kit I (Bio-Rad), with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

For western blot analysis, 100 µg of total protein was resolved on a 12% (v/v) SDS-PAGE gel at a constant voltage of 100 V for 3 h. Proteins were transferred onto a 0.2 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). The membrane was equilibrated in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) for 10 min, followed by blocking in 5% (w/v) skim milk prepared in TBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST) for 5 h at room temperature. The membrane was incubated overnight at 4°C in TBST with 5% skim milk containing primary antibodies (1:1000 dilution), either mouse anti-FLAG monoclonal antibody (Millipore Sigma) or mouse anti-HA-tag monoclonal antibody (GenScript). After primary antibody incubation, the membrane was washed three times (10 min each) in TBST and subsequently incubated for 1 h at room temperature in TBST containing 5% skim milk and goat anti-mouse horseradish peroxidase (GAM-HRP) conjugate (1:20,000 dilution). The membrane was washed twice in TBST, and protein detection was performed using Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad). Following chemiluminescence detection, the membrane was

washed twice in TBST and stained with 0.5% (w/v) Ponceau S solution (0.5% [w/v] Ponceau S in 1% [v/v] acetic acid) for 1 min to assess protein transfer efficiency. Chemiluminescence signals and Ponceau S-stained blots were visualized using the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) and analyzed with Image Lab software (Bio-Rad). The molecular weight of detected proteins was confirmed using the Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

2. 8. Enzymatic assays and CBGA detection

In vitro enzymatic assays were conducted using three biological replicates in a total reaction volume of 100 μ L, following the protocol of (Fantino et al., 2024). Specifically, 1 mg of soluble total protein extract was added to the reaction buffer (100 mM HEPES, pH 7.5; 25 mM $MgCl_2$; 2 mM OA; and 2 mM GPP) and incubated at 30°C for 16 h. Proteins were precipitated with 2% (v/v) trichloroacetic acid to terminate the reaction, and metabolites were extracted using 300 μ L of HPLC-grade methanol. The extracts were filtered through 0.22 μ m nylon filters, dried using a Savant SPD1010 SpeedVac concentrator (Thermo Scientific), and reconstituted in 100 μ L of HPLC-grade methanol. Samples were then diluted 10-fold in the mobile phase (0.1% (v/v) formic acid in Milli-Q water / 0.1% (v/v) formic acid in methanol, 30:70) and analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

2. 9. Olivetolic acid supplementation and metabolite extraction

C. reinhardtii cells grown for five days in 25 mL of TAP media were supplemented with 2 mM of olivetolic acid (OA). The culture was incubated for 24 h. Cells were harvested by centrifugation at 3,500 $\times$ g for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the conical tubes were inverted to dry. Metabolites were extracted using methanol at a ratio of 1 mL per 100 mg of fresh biomass. Samples were vortexed for 30 sec and incubated overnight at -20°C. The extract (supernatant) was separated from the pellet by centrifugation at 3,500 $\times$ g for 10 minutes at 4°C, followed by sample filtration through 0.22 μ m nylon syringe filters. Filtered samples were stored at -20°C for metabolite analysis.

2. 10. Cannabinoids and precursors standards

To perform the detection of the metabolite by high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD) and coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS), the following cannabinoids and precursors were used as standards: olivetolic acid (OA, CAS 491–72-5) and olivetol (OL, CAS 500–66-3) were purchased from Santa Cruz biotechnologies (Dallas United states). Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC, CAS 1972-08-3), cannabidiol (CBD, CAS 13956–29-1), cannabinol (CBN, CAS 521–35-7), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (THCA, CAS 23978–85-0), cannabidiolic acid (CBDA, CAS 1244-58-2), cannabigerolic acid (CBGA, CAS 25555–57-1), cannabichromene (CBC, CAS 20675–51-8), cannabigerol (CBG, CAS 25654–31-3), tetrahydrocannabivarin (THCV, CAS 31262–37-0) and cannabidivarin (CBDV, CAS 24274–48-4) were purchased from Agilent Technologies (QC, Canada). Cannabinolic acid (CBNA, CAS 2808-39-1) was purchased from Sigma-Aldrich (ON, Canada).

2.11- HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis

Initial analyses were performed using high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). Chromatographic separation of analytes was achieved using an InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 × 100 mm, 2.7 mm; Agilent Technologies, QC, Canada) maintained at 30°C. A 10 µL sample was injected into the analytical system. The mobile phase consisted of: (A) 30% of 0.1% (v/v) formic acid in Milli-Q water and (B) 70% of 0.1% (v/v) formic acid in methanol was used. The flow rate was set to 1 mL/min, and the HPLC gradient program was as follows: 0 min, 70% B; 1.0 min, 70 % B; 6.0 min, 77% B; 15.0 min, 90 % B; 15.1 min, 70 % B and 18.0 min, 70 % B. Each run lasted 18.5 min, including column reconditioning before the next injection. The diode array detector was set to acquire the wavelength range of 190 to 400 nm using a deuterium (D₂) lamp, with UV detection at 220 nm. Compounds were identified by comparing retention time and maximum absorption wavelengths to those of reference standards (**Table S3**, section 2.10). Calibration curves were generated using CBGA standard solutions (10 mg/L and 100 mg/L in HPLC-grade methanol). These solutions were serially diluted to prepare calibration standards at 0.5, 1, 2, 4, 5, 10, 25, 50, and 100 mg/L, each analyzed in triplicate. The standard solutions were injected into the HPLC-DAD

system, and calibration curves were plotted based on the area under the curve (AUC) versus analyte concentration. These curves were used to quantify OA, OL, and CBGA in enzymatic and supplementation assays (**Figure S3 A-C**).

Confirmatory analyses were conducted using HPLCMS/MS (Agilent, QC, Canada) equipped with an Agilent Jet Stream ionization source, a binary pump, an autosampler, and a column compartment. Compound separation was achieved using an InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 column (4.6×100 mm, 2.7 mm). Five microliters of each sample were injected into the column set at 50°C. A gradient method made of (A) 0.1% (v/v) formic acid in Milli-Q water and (B) 0.1% (v/v) formic acid in methanol with a flow rate of 0.5 mL/min was used to achieve chromatographic separation. The HPLC elution program was as follows: 0 min, 70 % B; 7.0 min, 100 % B; 10 min, 100 % B; 12.0 min, 70 % B. The total run time was 14 min per sample. The parameters used in the MS/MS source were set as follows: gas flow rate 8 L/min; gas temperature 220 °C; nebulizer 55 psi; sheath gas flow 12 L/min; sheath gas temperature 380°C; capillary voltage 4500 V; and nozzle voltage 0 V. Agilent MassHunter Data Acquisition (version 1.2) and MassHunter Qualitative Analysis (version 10.0) software were used for data acquisition and processing respectively. Sample analyses were conducted in triggered multiple reaction monitoring (tMRM) acquisition mode, allowing compound identification using authentic standards. MRM transitions and MS/MS parameters used for targeted compounds identification are provided in the supplementary **Table S4**.

2.12- Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 9.4.1, GraphPad Software, US). Data are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) from two or three biological replicates, each conducted at least twice in independent experiments.

III. 3. Results

3. 1. Production of NphB and CBDAS enzymes in *E. coli*

Before proceeding with *C. reinhardtii* transformation, we sought to confirm that the codon-optimized *NphB* and *CBDAS* sequences were correctly expressed, translated, and functional in a heterologous system. *E. coli* is a widely used, rapid, and cost-effective model for preliminary expression testing. The two genes *NphB*_{G286S/Y288A} (hereafter *NphB*) from *Streptomyces* sp. strain CL190 (Valliere et al., 2019) and *CBDAS* from *Cannabis sativa* (Taura et al., 2007c) were codon-optimized for expression in the *C. reinhardtii* nuclear genome. Two expression cassettes were designed to evaluate their activity in *E. coli*. The first contained *NphB* alone; the second encoded a fused transgene, *NphB*-2A-*CBDAS* (**Figure 3. 2A**). In the latter, both genes were expressed from a single open reading frame (ORF) by linking the *NphB* to the N-terminus of the *CBDAS* using an extended FMDV2A self-cleaving peptide (Plucinak et al., 2015). The construct included N-terminal 2xFlag and C-terminal 2xHA tags.

The *E. coli* strain Rosetta BL21 (DE3) pLysS was transformed with the recombinant plasmids to express transgenes and produce proteins. Cell lysates were used to assess protein accumulation and enzymatic activity. When expressed alone, the NphB protein was detected by SDS-PAGE (**Figure 3. 2B**). The fused protein NphB-2A-CBDAS was detected by western blot (WB) using an anti-HA antibody, appearing predominantly as the uncleaved fusion protein (**Figure 3. 2C**).

CBGA and CBDA production was evaluated using GPP and OA as substrates (**Figure 3. 2D**) and analyzed by HPLC-DAD, followed by confirmation with HPLC-MS/MS (**Figure S4A and B**). The NphB enzyme showed *in vitro* activity in both constructs but produced significantly more CBGA when expressed alone (193 ± 31 mg/L) compared to co-expression with CBDAS (2.3 ± 0.1 mg/L) (**Figure 3. 2E**, $p < 0.0001$). Although CBDAS protein accumulated, CBDA was not detected in the enzymatic assay, suggesting the enzyme was inactive (**Figure S4A**).

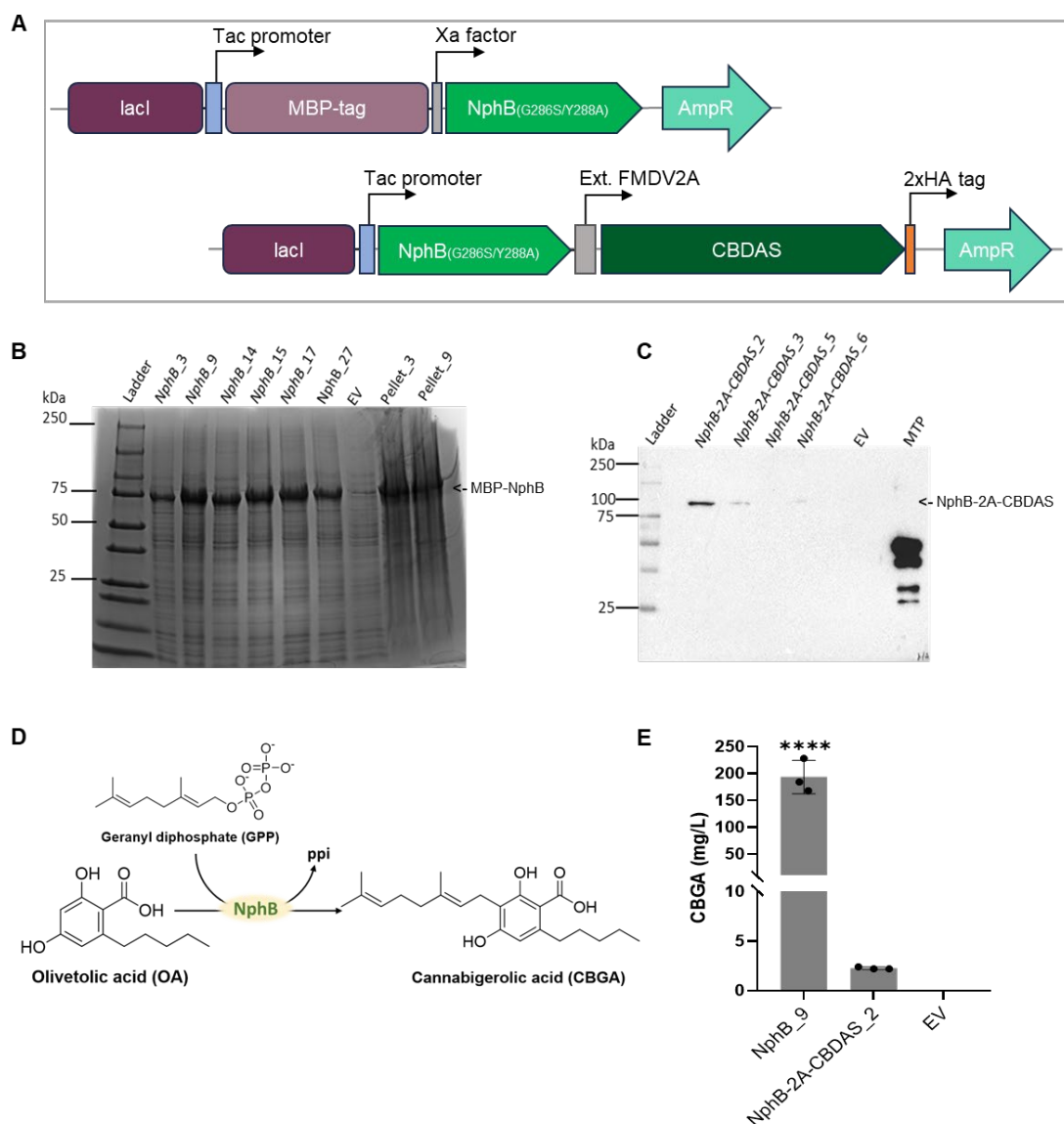


Figure 3. 2. Expression of *NphB* and *CBDAS* in *E. coli*.

NphB expression and co-expression with *CBDAS* (*NphB-2A-CBDAS*) in *E. coli* led to the accumulation of the protein of both genes, but only *NphB* was functionally active. A) expression cassettes; B) Coomassie-stained SDS gel showing the *NphB* protein (fused to MBP-tag ≈ 75 kDa) accumulation compared to the EV; C) Western blot detection of *NphB-2A-CBDAS* (≈ 100 kDa) using HA antibody, the lower panel is the cropped Coomassie-stained SDS gel after transfer onto the PVDF membrane; D) *NphB* *in vitro* enzymatic reaction leading to the synthesis of CBGA from the C–C prenylation of olivetolic acid (OA) by geranyl diphosphate (GPP); E) CBGA concentration after *in vitro* enzymatic assays using *NphB* and *NphB-2A-CBDAS* protein extracts. CBGA quantification in different samples was determined using the standard curve plotted with the commercial CBGA standard used in the HPLC-DAD runs. EV: empty vector, MTP: Multi-Tag protein, 2A: FMDV2A. $n=3$, results are shown as mean $\pm$ standard deviation; $p < 0.0001$.

These results demonstrate that the codon-optimized *NphB* and *CBDAS* genes are effectively expressed and translated in *E. coli*, with detectable protein accumulation. However, cytosolic expression of *NphB* alone yields higher levels of a functional enzyme, whereas co-expression with *CBDAS* in a single ORF reduces protein accumulation and results in an inactive *CBDAS* enzyme.

3. 2. Co-expression of *NphB* and *CBDAS* transgenes as a single ORF in the microalga *C. reinhardtii*

We hypothesized that using a eukaryotic photosynthetic heterologous host with demonstrated potential in terpene biosynthesis, such as *C. reinhardtii*, could facilitate CBDA production. As a first step, we used a construct encoding a bicistronic transgene *NphB*-2*A*-*CBDAS* (hereafter referred to as C1) driven by the *C. reinhardtii* fusion promoter ARp (a hybrid of the *Heat-Shock Protein 70A* and the *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit* gene promoters) (**Figure 3. 3**) (Schroda et al., 2002).

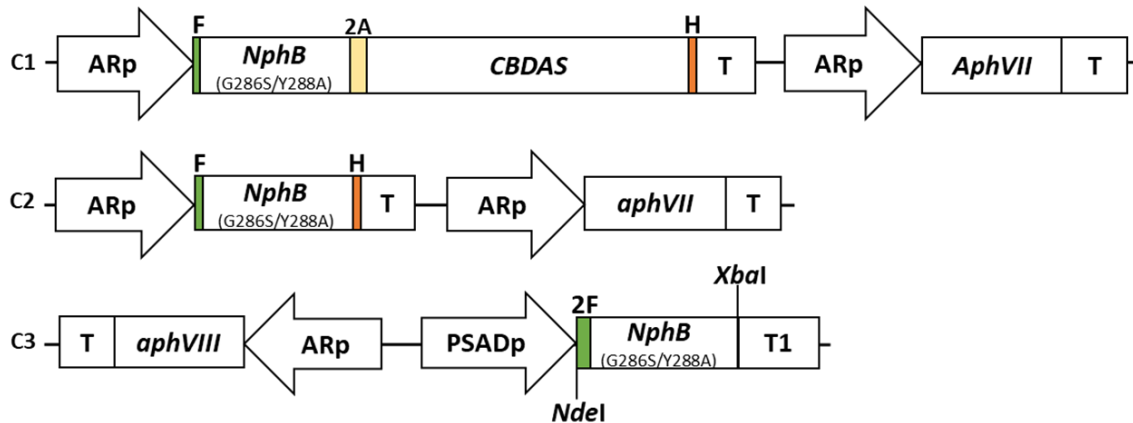


Figure 3. 3. Genetic constructs used in the present study.

C1, the bicistronic genetic construct containing the double-mutated soluble aromatic prenyl transferase gene (*NphB*_{G286S/Y288A}) from streptomyces sp. strain CL190 (Valliere et al. 2019) linked to the *C. sativa*'s cannabidiolic acid synthase gene (*CBDAS*) by the extended Foot and Mouth Disease Virus 2A (*extFMDV2A*) peptide sequence (Plucinak et al. 2015; Taura et al. 2007). **C2** is the monocistronic genetic construct harboring the *NphB* gene. Genes sequences of the C1 and C2 constructs were tagged in their N and C-terminal regions with Flag (F) and HA (H)-tags, respectively, and their expression was driven by the *C. reinhardtii* fusion promoter *HSP70A-RBCS2/5'UTR* (ARp) and its *3'UTR/RBCS2* terminator (T). The two constructs (C1 and C2) were cloned into the pOPt_ *mRuby2* vector backbone harboring the Hygromycin B resistance gene (*aphVII*) as an antibiotic selection marker (Lauersen, Kruse, and Mussnug 2015). **C3** is the monocistronic genetic construct with the *NphB* gene under the regulation of *C. reinhardtii* strong

promoter *PSAD* (PSADp) and *PSAD* terminator (T1). In construct C3, the *NphB* sequence was 2xFlag (2F)-tagged in the N-terminal region, and the construct was cloned into the pSL18 vector backbone harboring the paromomycin resistance gene (*aphVIII*) under the regulation of ARp and T as an antibiotic selection marker (Fischer and Rochaix 2001).

Construct C1 was successfully integrated into the nuclear genome of wild-type *C. reinhardtii* strain CC-125 via electroporation. Approximately 3,000 colonies were obtained on the selection plates (**Figure S5A; Table 3.1**). To evaluate transgene stability and integration, 384 randomly selected colonies were subcultured under antibiotic selection for at least five rounds before further analysis. **Figure S5G** illustrates the high-throughput subculturing layout used for clone screening. PCR analysis of these 384 clones targeted the full-length expression cassette, spanning from the promoter to the terminator. Twenty-one clones (5.5%) yielded a PCR product of the expected size (3.5 kb), indicating successful integration (**Figure S6A; Table 3.1**). The integrity of the inserted cassette was further confirmed by Sanger sequencing. These PCR-positive (PCR⁺) clones were cultivated in fresh TAP liquid medium with antibiotics and analyzed for transgene expression.

In *C. reinhardtii*, transgenic DNA is often subjected to epigenetic silencing mechanisms (Beauchemin et al., 2024; Neupert et al., 2020). Therefore, stable genomic integration does not guarantee robust gene expression. To assess transcriptional activity, we measured the relative expression of *NphB-2A-CBDAS* mRNA using RT-qPCR, normalized to the *histone H3* housekeeping gene. Among the 21 PCR⁺ clones, 16 (76.2%) exhibited detectable transgene expression, whereas no expression was observed in the empty vector (EV) or wild-type (WT) controls (**Figure 3. 4A; Table 3.1**). Notably, transgene expression levels varied substantially among clones, with transcript abundance in clone 21 being approximately 733-fold higher than in clone 16. This significant variability highlights the complexity of transgene regulation in *C. reinhardtii*, possibly due to transcriptional silencing or positional effects (Beauchemin et al., 2024; Schroda, 2019).

Despite these promising transcriptional results, protein accumulation was not detected by western blot (WB) in any of the tested transformants (n = 5), even though positive controls (purified multi-tagged proteins) were correctly identified (**Figure S7A**). No specific bands were observed at the expected sizes (~37 kDa for NphB, ~60 kDa for CBDAS, or ~100 kDa for the fused protein). Consistently, *in vitro* enzymatic assays using total protein extracts from these clones with OA and GPP as substrates failed to produce CBGA or

CBDA under the tested conditions. HPLC analysis of the enzymatic products showed no detectable cannabinoid peaks compared to the positive control (*NphB* expressed in *E. coli*) and the standard cannabinoid profiles (**Figure S8**).

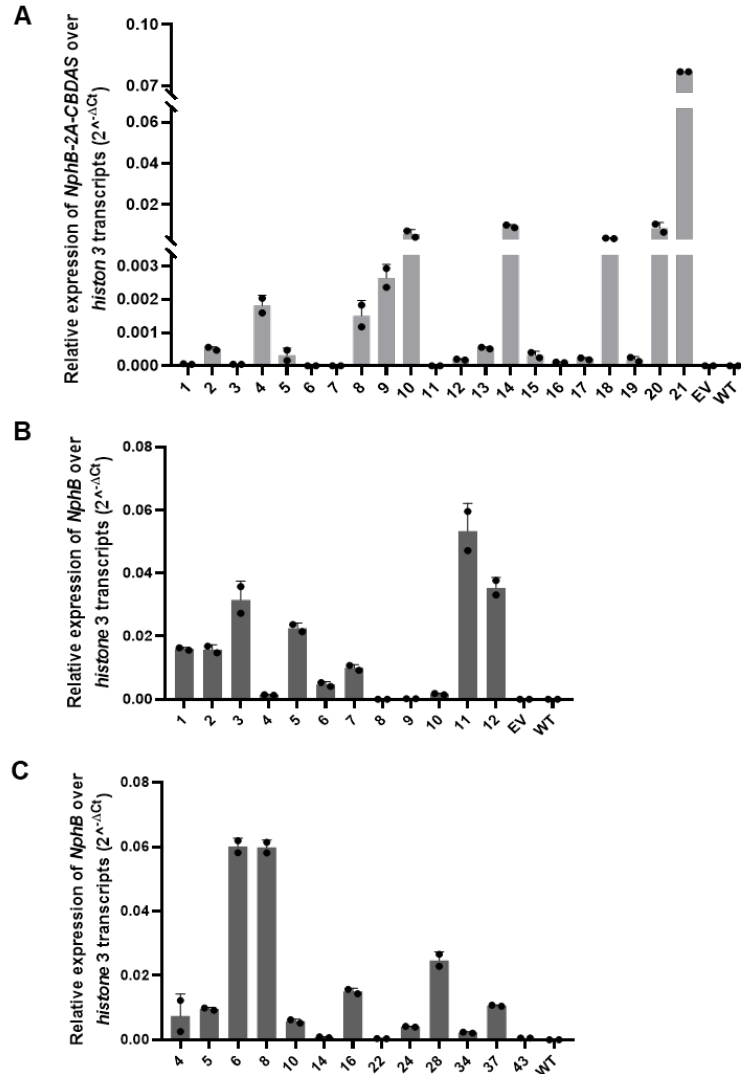


Figure 3. 4. Relative expression of *NphB* and *CBDAS* over *histone H3* transcripts.

The clones tested from the PCR+ transformants generated with the genetic constructs C1, C2, and C3 show significant variation in the transgenes' expression in clones from the same transformed cell lines. A) C1 expression in the strain CC-125, B) C2 expression in the strain CC-125, and C) C3 expression in the strain CC-5415. EV: empty vector; WT: wild type. n=2, results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

3. 3. Expression of NphB and CBDAS using independent ORFs

The absence of NphB and CBDAS protein accumulation in the *C. reinhardtii* transformants expressing the bicistronic construct C1 may be due to factors such as the large size of the transgenic DNA and potential regulatory complexity (Jinkerson et Jonikas, 2015; Schroda, 2019; Zhang et al., 2014). We therefore hypothesized that expressing the two genes separately, as monocistronic units, might help overcome these limitations.

To test this, we split the original C1 construct into two independent constructs: C2 and C4. These constructs carried *NphB* and *CBDAS*, each tagged with 2×Flag (N-terminal) or 2×HA (C-terminal) epitopes. Both constructs were driven by the same *C. reinhardtii* AR promoter and terminator used in C1 (**Figure 3.3; Figure S7C**). Strain CC-125 was transformed with either C2 alone or a combination of C2 and C4 to evaluate single and co-expression scenarios.

Following transformation with C2, approximately 2,000 colonies were obtained on selective plates (**Figure S5B; Table 3.1**). A subset of 384 colonies was randomly selected and subcultured through five passages on TAP medium supplemented with 15 mg/L hygromycin. PCR screening identified 140 positive clones (36.5%) harboring the complete expression cassette (**Figure S6B; Table 3.1**).

RT-qPCR analysis of selected C2 transformants revealed variable levels of *NphB* mRNA expression among clones from the same transformation line (**Figure 3. 4B**). Specifically, 10 out of 12 tested clones (83.3%) showed detectable *NphB* transcript levels, while expression was absent in wild-type (WT) and empty vector (EV) controls (**Figure 3. 4B; Table 3.1**). When co-transforming C2 and C4, *NphB* and *CBDAS* expression patterns were comparable to those observed in C1 and C2 alone (**Figure S7C**).

Despite the transcriptional activity, western blot analysis revealed no detectable accumulation of the expected proteins. As with the C1 construct, only non-specific bands were observed using the anti-Flag antibody, and no bands corresponding to the expected molecular weights of NphB or CBDAS were detected (**Figure S7B and D**). Additionally, *in vitro* enzymatic assays performed with protein extracts from the transformants failed to yield CB metabolites, corroborating the lack of functional protein accumulation.

These results indicate that the NphB and CBDAS coding sequences were successfully integrated into the nuclear genome and transcribed, but they did not produce functionally

active enzymes. This suggests that post-transcriptional silencing or translational repression may be affecting protein expression. Known variables such as the host strain, promoter and terminator sequences, or transgene sequence context in *C. reinhardtii* may contribute to these effects (Geisler et al., 2021; Schroda, 2019).

Stable expression and functional accumulation of NphB, but not CBDAS, in *C. reinhardtii* under the PSAD regulatory elements

3. 4. PSAD-driven nuclear expression enables functional accumulation of NphB but not CBDAS in *C. reinhardtii*

Given the repeated absence of detectable CBDAS protein and enzymatic activity under various genetic configurations, including constructs driven by the *PSAD* promoter and terminator, we excluded CBDAS from further optimization efforts and focused exclusively on enhancing NphB expression. These adverse outcomes, although not shown here, strongly suggest that CBDAS expression in *C. reinhardtii* under the tested conditions remains a significant bottleneck and warrants independent investigation beyond the scope of this study.

We therefore constructed a new expression cassette (C3) in which the codon-optimized *NphB* gene was placed under the control of the *C. reinhardtii* nuclear *PSAD* promoter and terminator (**Figure 3. 3**). This cassette was introduced by electroporation into the nuclear genome of the wild-type CC-125 strain. Six to seven days post-transformation, approximately 2,000 colonies were obtained on TAP agar plates supplemented with 15 mg/L paromomycin (**Figure S5D; Table 3.1**). As with previous constructs, 384 colonies were randomly selected and subcultured through five rounds of antibiotic selection. Colony PCR screening identified 55 transformants (14.3%) with a fully integrated expression cassette (**Table 3.1**).

To evaluate transgene expression and protein accumulation, 23 of the PCR+ clones were cultured in 25 mL TAP medium for 5 days (late exponential growth phase). Among these, 17 maintained stable transgene integration (**Figure S6C; Table 3.1**). Western blot analysis revealed that 15 out of 17 clones (88.2%) produced a protein band of ~37 kDa, consistent with the expected size of NphB (**Figure 3. 5A; Table 3.1**). These results confirm that the

PSAD promoter and terminator efficiently drive transgene expression in *C. reinhardtii*, leading to the successful accumulation of functional NphB.

3. 5. Assessment of *NphB* Expression in Multiple *C. reinhardtii* Strains

To investigate whether the genetic background of *C. reinhardtii* influences the expression of heterologous genes, we introduced the C3 expression cassette, harboring *NphB* under the control of the *PSAD* promoter and terminator, into two additional wild-type strains: CC-1690 and CC-5415. After electroporation, we observed notable differences in transformation efficiency and protein expression across strains. Indeed, approximately 3,000 colonies were obtained for CC-1690 and only 44 for CC-5415, compared to about 2,000 for CC-125 (**Figure S5D-F; Table 3.1**). PCR screening of transformants revealed successful integration of the full-length C3 cassette in 19.0% (73/384) of CC-1690 clones and 29.5% (13/44) of CC-5415 clones, compared to 14.3% (55/384) in CC-125 (**Figure S6C-E; Table 3.1**).

Quantification of *NphB* mRNA expression relative to the housekeeping gene *histone 3* in CC-5415 PCR+ clones showed expression profiles consistent with those previously observed for C2 (**Figure 3. 4C, Table 1**). Western blot analysis confirmed the accumulation of the 2xFlag-NphB protein (~37 kDa) in 82.6% (20/23) of CC-1690 and 46.2% (6/13) of CC-5415 transformants. This contrasts with the 88.2% (15/17) of CC-125 clones exhibiting detectable NphB protein (**Figure 3. 5A-C; Table 3.1**).

These results demonstrate that NphB can be functionally expressed in all three *C. reinhardtii* strains tested, although expression efficiency and protein accumulation levels vary. This strain-dependent variability highlights the importance of host background when optimizing nuclear transgene expression in *C. reinhardtii*.

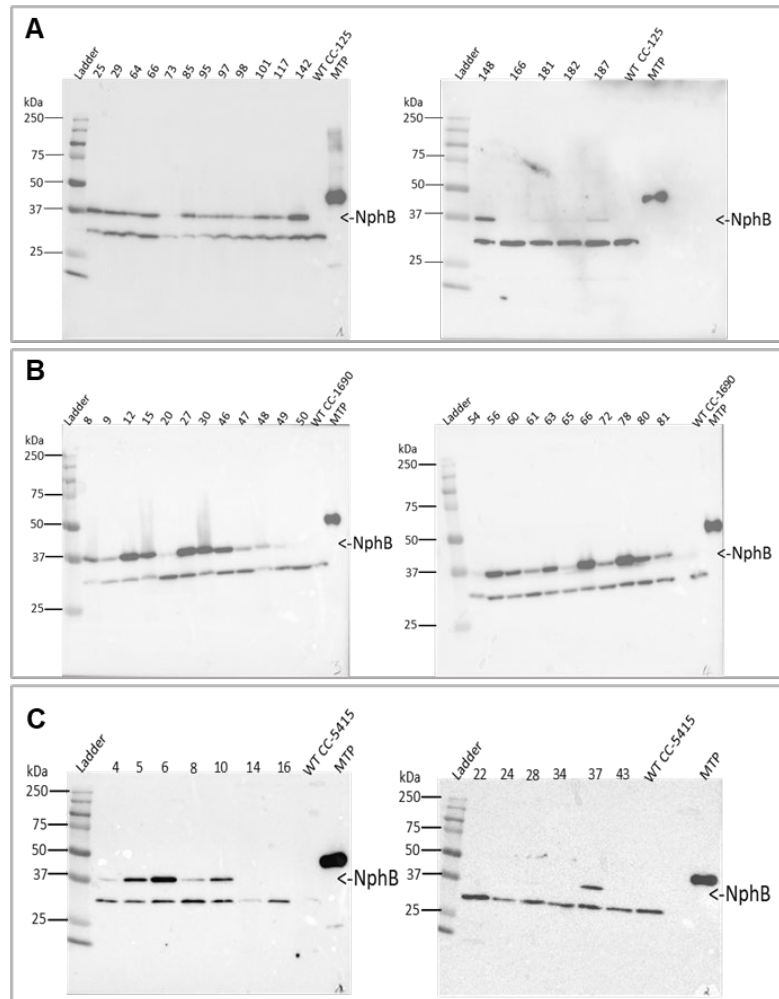


Figure 3. 5. NphB protein detection by Western blot.

Expressing NphB under the PSAD regulation led to accumulating the protein of interest. In different WT strains of *C. reinhardtii*, Western blot (WB) detected the protein of interest on the membrane after incubation with the Flag antibody. A) NphB detection in 13 clones among the 15 PCR+ clones tested from the strain CC-125; B) NphB detection in 20 clones among the 23 PCR+ clones tested from the strain CC-1690; C) NphB detection in 6 clones among the 13 PCR+ clones tested from the strain CC-5415. *NphB*'s expected size is ≈ 37 kDa; MTP: multi-tag protein used as a positive control for the antibody treatment; WT: wild type.

Table 3. 1. Summary of stable recombinant *C. reinhardtii* cells.

Clones after five rounds of subculturing collated with the PCR-positives clones and the transformants exhibiting NphB activity in vitro, leading to the synthesis of CBGA. ND = Not Done

<i>C. reinhardtii</i> strains	Vectors and resistance marker	Promoter/terminator	Genetic constructs	Number of colonies after transformation	Randomly selected clones	PCR+ clones (%)	RT-qPCR+ clones (%)	Clones tested for protein detection	WB+ clones (%)	NphB active clones (%)
CC-125	pOpt_ <i>mRuby2-APHVII</i>	<i>HSP70A-RBCS2/3'UTR</i>	C1	≈ 3000	384	21 (5.5%)	12/21 (57.1%)	21	0 (0%)	0 (0%)
			C2	≈ 2000	384	140 (36.5%)	10/12 (83.3%)	92	0 (0%)	0 (0%)
	pSL18- <i>APHVIII</i>	<i>PSAD/PSAD</i>	C3	≈ 2000	384	55 (14.3%)	ND	17	15 (88.2%)	13 (86.7%)
CC-1690	pSL18- <i>APHVIII</i>	<i>PSAD/PSAD</i>	C3	≈ 3000	384	73 (19%)	ND	23	20 (82.6%)	19 (95%)
CC-5415	pSL18- <i>APHVIII</i>	<i>PSAD/PSAD</i>	C3	44	44	13 (29.5%)	11/13 (84.6%)	13	6 (46.2%)	6 (100%)

3. 6. *C. reinhardtii*-Expressed NphB Catalyzes CBGA Production *in vitro*

To investigate the ability of *C. reinhardtii*-expressed NphB to catalyze CBGA production, we first attempted *in vivo* synthesis by supplementing the culture medium with 2 mM olivetolic acid (OA) at the late exponential growth phase. Metabolites were extracted 24 hours later and analyzed by HPLC-MS/MS (**Figures S12A-B**). Despite confirmed NphB protein accumulation in transformants, CBGA was not detected under these conditions.

We therefore conducted *in vitro* enzymatic assays using the soluble protein fraction from transformants, with OA and geranyl diphosphate (GPP) as substrates. Given the number of WB⁺ transformants (n = 41) and the cost of substrates, we implemented an initial screening using a single replicate per clone and 0.5 mM of each substrate to identify candidates exhibiting NphB activity. CBGA production was detected in 38 clones, as evidenced by a signal at a retention time of 8.309 min consistent with the CBGA standard and a positive control containing recombinant NphB expressed in *E. coli* (**Figures S8-S9**). This compound was identified as CBGA based on its molecular ion (m/z 361) and fragmentation pattern, confirmed by HPLC-MS/MS (**Figure S10**). No CBGA signal was observed in WT protein reactions.

Among the strains tested, CC-1690 and CC-5415 showed slightly higher proportions of active clones, with 19/20 (95%) and 6/6 (100%) clones, respectively, exhibiting NphB activity, compared to 13/15 (86.7%) for CC-125 (**Table 3.1, Table S5**). The clones with the highest NphB activity from each strain, clones 12 (CC-1690), 25 (CC-125), and 37 (CC-5415), were selected for confirmation in triplicate. Western blot confirmed NphB accumulation in all three (**Figure 3. 6A**). In contrast, no NphB signal was detected in extracts from negative controls (EV, WT) or clones 21 and 5 from constructs C1 and C2, respectively, consistent with previous findings (sections 3.2 and 3.3).

HPLC-DAD analysis further validated NphB enzymatic activity by detecting a product with a retention time of 10.146 min, matching the CBGA standard (**Figure S11**). Increasing substrate concentrations (OA and GPP) significantly enhanced CBGA yields, resulting in 2.6- to 6.3-fold higher production compared to assays using 0.5 mM substrates, which were below the HPLC-DAD detection threshold of 100 µg/L (**Figure 3. 6B; Table S5**). Clone 37 produced the highest CBGA titer (633 ± 58 µg/L), followed by clones 12 (367 ± 58

$\mu\text{g/L}$) and 25 ($267 \pm 58 \mu\text{g/L}$) (**Figure 3. 6C**). In contrast, no CBGA signal above background was detected in extracts from clones 5 and 21, or the EV and WT controls. Statistical analysis using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test confirmed that CBGA peak areas for the WB⁺ clones (12, 25, and 37) were significantly higher ($p < 0.0001$) than those from WB⁻ clones and negative controls (**Figure 3. 6D**).

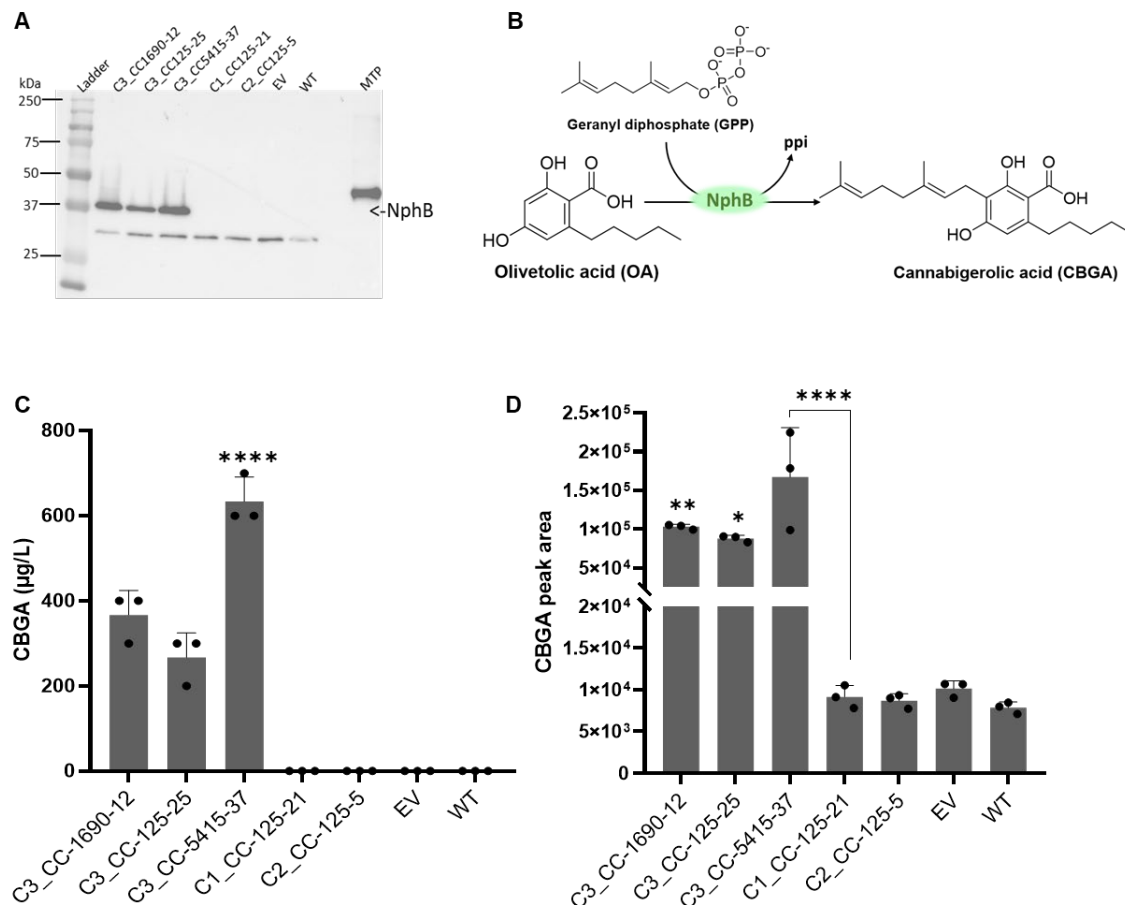


Figure 3. 6. Functional NphB protein is accumulated in *C. reinhardtii* strains.

C. reinhardtii successfully expressed the *NphB* transgene under the PSAD regulation, accumulating active proteins. A) Western blot showing NphB detection in clones 12, 25, and 37, respectively, selected from strains CC-1690, 125, and 5415, compared to the negative control EV and WT, but also to clones 21 and 5, respectively selected from C1 and C2 transformants expressing NphB-2A-CBDAS and NphB under AR promoter and terminator regulation; B) NphB *in vitro* enzymatic reaction leading to the synthesis of CBGA from the C–C prenylation of olivetolic acid (OA) by geranyl diphosphate (GPP); C) CBGA concentration obtained after *in vitro* enzymatic assays using proteins crude extracts from the *C. reinhardtii* transformants expressing *NphB*, analyzed and quantified by HPLC-DAD using commercial CBGA standard curve; D) HPLC-MS/MS confirmation of CBGA production generating peak areas proportional to CBGA concentration in each sample. EV: empty vector,

MTP: Multi-Tag protein, 2A: FMDV2A, WT: wild type. n=3, results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

Altogether, these findings provide the first evidence of functionally active NphB enzyme production in the nuclear genome of *C. reinhardtii*, which can catalyze CBGA synthesis *in vitro*. Despite the absence of detectable CBGA accumulation *in vivo*, the successful *in vitro* enzymatic activity validates the biological functionality of the heterologously expressed NphB. These results provide a foundation for future optimization strategies to enhance precursor availability, refine subcellular targeting, and improve metabolic compartmentalization, key factors that will be discussed in the following section.

III. 4. Discussion

This study demonstrates the feasibility of using *C. reinhardtii* as a chassis for expressing heterologous genes involved in cannabinoid biosynthesis. In particular, we achieved functional expression of the prenyltransferase *NphB* in the cytosol, with protein accumulation dependent on the promoter/terminator pair. However, consistent with prior studies, *CBDAS* expression in the cytosol failed to yield active protein (Fantino et al., 2025), highlighting a significant bottleneck in reconstituting the complete cannabinoid pathway in the microalgae.

Our bicistronic and monocistronic constructs, encoding a codon-optimized NphB (G286S/Y288A mutant) and CBDAS from *Cannabis sativa* (Taura et al., 2007c; Valliere et al., 2019), were first validated in *E. coli*, where NphB showed robust CBGA production (up to 193 ± 31 mg/L) in the monocistronic configuration (**Figure 3. 2E**). Conversely, the co-expression with CBDAS (bicistronic construct) led to lower CBGA titers (2.3 ± 0.1 mg/L), possibly due to incomplete 2A peptide cleavage or reduced *NphB* expression (Donnelly et al., 1997; Luke et Ryan, 2024; Zirpel et al., 2017). Notably, while CBDAS protein was detectable, no CBDA was synthesized *in vitro*, reinforcing previous observations that CBDAS functionality may require eukaryotic expression systems with proper folding, glycosylation, and subcellular localization (Fantino et al., 2025; Geissler et al., 2018; Schmidt et al., 2024; Zirpel et al., 2018a; Zirpel et al., 2015).

To express these genes in *C. reinhardtii*, we introduced various constructs into the nuclear genome of multiple wild-type strains (CC-125, CC-1690, CC-5415). Under the HSP70A-

RBCS2 (AR) promoter, transgene transcription occurred but did not result in detectable NphB or CBDAS proteins, indicating post-transcriptional silencing or insufficient mRNA processing (Schroda, 2019; Tran et Kaldenhoff, 2020). Switching to the PSAD promoter and terminator resulted in 88.2% of transformants (in CC-125) accumulating NphB protein in the cytosol, enabling CBGA biosynthesis *in vitro* at $633 \pm 58 \mu\text{g/L}$ (**Figure 3. 6C**). This pattern was reproducible in the other strains tested, supporting the robustness of PSAD regulatory elements for expressing this transgene (Fischer et Rochaix, 2001; Geisler et al., 2021; Kumar et al., 2013).

Nevertheless, the *in vivo* production of CBGA in *C. reinhardtii* remains elusive. Even upon exogenous olivetolic acid supplementation, no CBGA was detected in culture media or biomass. This points to potential limitations in precursor availability, notably the cytosolic pool of geranyl pyrophosphate (GPP) or inefficient uptake and conversion of olivetolic acid. Similar issues have been reported in other algal systems engineered for cannabinoid production (Fantino et al., 2024). Strategies to overcome this limitation include overexpression of genes in the MEP pathway (e.g., *DXS*, *DXR*, *HDR*) or in the hexanoic acid pathway (e.g., *AAEI*), suppression of native GPP-consuming pathways (e.g., competing terpene synthases), expression of transgenes through the chloroplastic genome, or employing synthetic scaffolds to enhance substrate channeling (Goold et al., 2024; Lauersen et al., 2018; Luo et al., 2019; Mayfield et al., 2007; Wichmann et al., 2018). In addition, varying culture conditions during olivetolic acid supplementation, including light intensity, nutrient levels, and timing, may improve precursor assimilation and enzymatic conversion, offering a practical route to *in vivo* CBGA production (Fantino et al., 2024; Zhang et al., 2019).

The persistent failure to detect CBDAS protein or CBDA further highlights the need for subcellular targeting strategies. ER localization may enhance CBDAS folding and function, as demonstrated in *Phaeodactylum tricornutum*, yeast, and *Nicotiana benthamiana* (Fantino et al., 2025; Geissler et al., 2018; Schmidt et al., 2024; Zirpel et al., 2018a; Zirpel et al., 2015). Fusion with ER signal peptides or retention sequences (e.g., HDEL) should be tested (Chung et al., 2024; Perozeni et al., 2023; Rasala et al., 2014). Beyond the ER, the vacuole may also serve as a promising destination for CBDAS, offering a compartment with a distinct redox environment and reduced protease activity that could

improve enzyme stability and preserve catalytic function (Bolaños-Martínez et al., 2022; Dementyeva et al., 2021; Luo et al., 2019; Zirpel et al., 2018a). Furthermore, since cannabinoid synthases like CBDAS, CBCAS, and THCAS require flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor for enzymatic activity (Romero et al., 2020; Shoyama et al., 2012), ensuring adequate FAD availability or cofactor-binding efficiency in the heterologous host may be essential for restoring functional activity and should be considered in future engineering strategies.

One crucial factor that may underlie inconsistent or failed expression of nuclear transgenes in *C. reinhardtii* is incorrect mRNA processing. Nuclear-expressed transgenes often suffer from inefficient splicing, poor transcript stability, or defective nuclear export, especially when using intronless coding sequences (Aschern et al., 2025; Baier et al., 2020; Jaeger et al., 2019; Schroda, 2019), as was the case for both NphB and CBDAS in our study. The absence of introns can result in mRNA not being adequately recognized by the splicing machinery, leading to nuclear retention or degradation (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Lumbreras et al., 1998; Schroda, 2019). In particular, CBDAS transcripts may have been transcribed but failed to be exported or translated due to such processing errors. Cryptic splice sites introduced during codon optimization or weak 3' UTR sequences may have contributed to aberrant mRNA forms or destabilization (Geisler et al., 2021; Jaeger et al., 2019; Schroda, 2019; Schroda et Remacle, 2022). These possibilities reinforce the importance of intron incorporation (Baier et al., 2020; Jaeger et al., 2019; Rose, 2019), validated terminators (Geisler et al., 2021; Schroda, 2019), and transcript-stabilizing elements in future construct designs to ensure robust mRNA maturation and expression.

Promoter choice also emerged as a critical factor (Einhaus et al., 2021; Milito et al., 2024; Milito et al., 2023). While the AR promoter was sufficient for mRNA production, it failed to yield detectable protein in our constructs (**Figure S7 A-D**). In contrast, the PSAD promoter and terminator proved highly effective for NphB expression (**Figure 3. 5A-C**). Future designs should test synthetic or hybrid promoters and alternative terminators with more potent transcript stabilization properties (Crozet et al., 2018; Milito et al., 2024). Chromatin context and transgene insertion site variability must also be addressed via site-specific integration tools or insulators (Beauchemin et al., 2024; Ghribi et al., 2020; Neupert et al., 2020; Schroda, 2019; Schroda et Remacle, 2022).

Our results also confirm that multiple *C. reinhardtii* strains (CC-125, CC-1690, CC-5415) are suitable for heterologous expression of prenyltransferases. This expands the toolbox for strain selection and suggests that future efforts may benefit from strain-specific optimizations targeting cell wall properties, transformation efficiency, and endogenous protease activity (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Dementyeva et al., 2021; López-Paz et al., 2017; Neupert et al., 2020).

This study establishes a foundational framework for engineering *C. reinhardtii* as a green chassis for cannabinoid production. Future development opportunities include optimizing CBDAS expression through ER- or vacuole-targeting and intron integration, increasing GPP availability via pathway rewiring, and fine-tuning expression using advanced regulatory systems. Together, these strategies may enable sustainable, light-driven biosynthesis of cannabinoids in photosynthetic microalgae.

Authors Contributions:

Serge Basile Nouemssi: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing-original draft, Writing-review & editing. **Ayoub Bouhadada:** Investigation, Writing-review & editing. **Beauchemin Remy:** Conceptualization, Methodology, Writing-review & editing. **Alexandre Custeau:** Formal analysis, Validation. **Sarah-Eve Gelinas:** Formal analysis, validation, Writing-review & editing. **Natacha Merindol:** Conceptualization, Methodology, investigation, Data curation, Project administration, Writing-review & editing. **Fatma Meddeb-Mouelhi:** Conceptualization, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing-review & editing. **Hugo Germain:** Project administration, Resources, Supervision, Writing-review & editing. **Isabel Desgagne-Penix:** Conceptualization, Visualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing-review & editing.

Acknowledgments:

We acknowledge the financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through the Alliance program Award No ALLRP 570476-2021 to IDP. We also acknowledge additional support in the form of scholarships to R.B. and S.B.N. from Mitacs-Acceleration program grants no IT12310 to IDP. The authors wish to thank the industrial collaborator Algae-C for the sample and support, as well as the lab

members past and present, specifically Dre. Manel Ghribi, Dr. Bharat Bhusan, and Melodie B. Plourde.

Funding Statement:

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through the Alliance program Award No ALLRP 554429-20 and ALLRP 570476–2021 to IDP. Additional funding in the form of scholarships to R.B. and S.B.N. from Mitacs-Acceleration program grants Award No IT12310 to IDP was provided. Finally, financial support from the Canada Research Chairs on plant specialized metabolism Award No 950–232164 to I.D-P was also provided.

III. 5. References

1. Andre, C.M., J.-F. Hausman, and G. Guerriero, *Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules*. Frontiers in plant science, 2016. **7**: p. 174167.
2. Gülck, T., et al., *Synthetic Biology of Cannabinoids and Cannabinoid Glucosides in Nicotiana benthamiana and Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Natural Products, 2020. **83**(10): p. 2877-2893.
3. Romero, P., et al., *Comprehending and improving cannabis specialized metabolism in the systems biology era*. Plant Science, 2020. **298**: p. 110571.
4. Abd-Nikfarjam, B., et al., *Cannabinoids in neuroinflammatory disorders: Focusing on multiple sclerosis, Parkinsons, and Alzheimers diseases*. Biofactors, 2023. **49**(3): p. 560-583.
5. Al-Ghezi, Z.Z., et al., *Combination of cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol, ameliorates experimental multiple sclerosis by suppressing neuroinflammation through regulation of miRNA-mediated signaling pathways*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 466430.
6. van den Hoogen, N.J., et al., *Cannabinoids in chronic pain: therapeutic potential through microglia modulation*. Frontiers in Neural Circuits, 2022. **15**: p. 816747.
7. Abrams, D.I., *The therapeutic effects of Cannabis and cannabinoids: An update from the National Academies of Sciences, Engineering and Medicine report*. European journal of internal medicine, 2018. **49**: p. 7-11.
8. Hazekamp, A., et al., *The medicinal use of cannabis and cannabinoids—an international cross-sectional survey on administration forms*. Journal of psychoactive drugs, 2013. **45**(3): p. 199-210.
9. Dorbian. *Global Legal Cannabis Market Expected To Reach \$58 Billion In 2028*. 2024 30 May 2024]; Available from: <https://www.forbes.com/sites/irisdorbian/2024/03/07/global-legal-cannabis-market-expected-to-reach-58-billion-in-2028/?sh=465318e11d84>.
10. Gülck, T. and B.L. Möller, *Phytocannabinoids: origins and biosynthesis*. Trends in plant science, 2020. **25**(10): p. 985-1004.

11. Atakan, Z., *Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals*. Therapeutic advances in psychopharmacology, 2012. **2**(6): p. 241-254.
12. Shultz, Z.P., et al., *Enantioselective Total Synthesis of Cannabinoids A Route for Analogue Development*. Organic letters, 2018. **20**(2): p. 381-384.
13. Dattatraya H. Dethe, R.D.E., Samarpita Mahapatra, Saikat Das and Vijay Kumar B., *Protecting group free enantiospecific total syntheses of structurally diverse natural products of the tetrahydrocannabinoid family*. Chemical communications, 2015. **51**(14): p. 2871-2873.
14. Bolaños-Martínez, O.C., et al., *Harnessing the advances of genetic engineering in microalgae for the production of cannabinoids*. Critical Reviews in Biotechnology, 2022: p. 1-12.
15. Awwad, F., et al., *Bioengineering of the Marine Diatom Phaeodactylum tricornutum with Cannabis Genes Enables the Production of the Cannabinoid Precursor, Olivetolic Acid*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(23): p. 16624.
16. Zirpel, B., et al., *Engineering yeasts as platform organisms for cannabinoid biosynthesis*. Journal of biotechnology, 2017. **259**: p. 204-212.
17. Luo, X., et al., *Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast*. Nature, 2019. **567**(7746): p. 123-126.
18. Tan, Z., J.M. Clomburg, and R. Gonzalez, *Synthetic pathway for the production of olivetolic acid in Escherichia coli*. ACS Synthetic Biology, 2018. **7**(8): p. 1886-1896.
19. Taura, F., et al., *Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic Pichia pastoris*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **361**(3): p. 675-680.
20. Zhang, Y., et al., *Development of an efficient yeast platform for cannabigerolic acid biosynthesis*. Metabolic Engineering, 2023. **80**: p. 232-240.
21. Fantino, E., et al., *Extrachromosomal expression of functional Cannabis sativa cannabidiolic acid synthase in Phaeodactylum tricornutum*. Algal Research, 2025. **85**: p. 103889.

22. Fantino, E., et al., *Bioengineering Phaeodactylum tricornutum, a marine diatom, for cannabinoid biosynthesis*. Algal Research, 2024: p. 103379.
23. Sene, N., et al., *Impact of heterologous expression of Cannabis sativa tetraketide synthase on Phaeodactylum tricornutum metabolic profile*. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2025. **18**(1): p. 42.
24. Gagne, S.J., et al., *Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(31): p. 12811-12816.
25. Sirikantaramas, S., et al., *The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of $\Delta 1$ -tetrahydrocannabinolic acid synthase from Cannabis sativa L.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(38): p. 39767-39774.
26. Sirikantaramas, S., et al., *Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase, the Enzyme Controlling Marijuana Psychoactivity, is Secreted into the Storage Cavity of the Glandular Trichomes*. Plant and Cell Physiology, 2005. **46**(9): p. 1578-1582.
27. Taura, F., S. Morimoto, and Y. Shoyama, *Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from Cannabis sativa L.: Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(29): p. 17411-17416.
28. Taura, F., et al., *Phytocannabinoids in Cannabis sativa: recent studies on biosynthetic enzymes*. Chemistry & biodiversity, 2007. **4**(8): p. 1649-1663.
29. ElSohly, M. and W. Gul, *Constituents of Cannabis sativa*. Handbook of cannabis, 2014. **3**(1093): p. 187-188.
30. Hanuš, L.O., et al., *Phytocannabinoids: a unified critical inventory*. Natural product reports, 2016. **33**(12): p. 1357-1392.
31. Schmidt, C., M. Aras, and O. Kayser, *Engineering cannabinoid production in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Journal, 2024. **19**(2): p. 2300507.
32. Hussain, T., et al., *Cannabis sativa research trends, challenges, and new-age perspectives*. Iscience, 2021. **24**(12).

33. Kearsey, L.J., et al., *Structure of the Cannabis sativa olivetol-producing enzyme reveals cyclization plasticity in type III polyketide synthases*. The FEBS Journal, 2020. **287**(8): p. 1511-1524.
34. Degenhardt, F., F. Stehle, and O. Kayser, *The biosynthesis of cannabinoids*, in *Handbook of cannabis and related pathologies*. 2017, Elsevier. p. 13-23.
35. Carvalho, Â., et al., *Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids*. FEMS yeast research, 2017. **17**(4).
36. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. Journal of molecular biology, 2001. **305**(3): p. 567-580.
37. Ayakar, S.R., et al., *Metabolic Engineering of E. coli for the Biosynthesis of Cannabinoid Products*. 2020, Google Patents.
38. Page, J. and Z. Boubakir, *Aromatic prenyltransferase from Cannabis*. 2012. US 20120144523. 2018.
39. Bonitz, T., et al., *Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e27336.
40. Kuzuyama, T., J.P. Noel, and S.B. Richard, *Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 983-987.
41. Lim, K.J.H., et al., *Structure-Guided Engineering of Prenyltransferase NphB for High-Yield and Regioselective Cannabinoid Production*. ACS Catalysis, 2022. **12**(8): p. 4628-4639.
42. Qian, S., J.M. Clomburg, and R. Gonzalez, *Engineering Escherichia coli as a platform for the in vivo synthesis of prenylated aromatics*. Biotechnology and bioengineering, 2019. **116**(5): p. 1116-1127.
43. Valliere, M.A., et al., *A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1-9.
44. Merchant, S.S., et al., *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*. Science, 2007. **318**(5848): p. 245-250.

45. Einhaus, A., et al., *Engineering a powerful green cell factory for robust photoautotrophic diterpenoid production*. Metabolic Engineering, 2022.
46. Kong, F., et al., *Molecular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant and Cell Physiology, 2019. **60**(6): p. 1184-1196.
47. Schroda, M. and C. Remacle, *Molecular advancements establishing Chlamydomonas as a host for biotechnological exploitation*. Frontiers in Plant Science, 2022. **13**: p. 911483.
48. Schroda, M., *Good news for nuclear transgene expression in Chlamydomonas*. Cells, 2019. **8**(12): p. 1534.
49. Gallaher, S.D., et al., *Chlamydomonas genome resource for laboratory strains reveals a mosaic of sequence variation, identifies true strain histories, and enables strain-specific studies*. The Plant Cell, 2015. **27**(9): p. 2335-2352.
50. Beauchemin, R., et al., *Successful reversal of transgene silencing in Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology Journal, 2024. **19**(1): p. 2300232.
51. Baier, T., et al., *Introns mediate post-transcriptional enhancement of nuclear gene expression in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS genetics, 2020. **16**(7): p. e1008944.
52. Baier, T., et al., *Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Nucleic acids research, 2018. **46**(13): p. 6909-6919.
53. Zhao, M.-L., et al., *Metabolic engineering of the isopentenol utilization pathway enhanced the production of terpenoids in Chlamydomonas reinhardtii*. Marine Drugs, 2022. **20**(9): p. 577.
54. Lauersen, K.J., et al., *Phototrophic production of heterologous diterpenoids and a hydroxy-functionalized derivative from Chlamydomonas reinhardtii*. Metabolic engineering, 2018. **49**: p. 116-127.
55. Lauersen, K.J., et al., *Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Metabolic engineering, 2016. **38**: p. 331-343.

56. Gorman, D.S. and R. Levine, *Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1965. **54**(6): p. 1665-1669.
57. Kropat, J., et al., *A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal, 2011. **66**(5): p. 770-780.
58. Harris, E.H. and E.H. Harrisduke, *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1*. 2009: Elsevier Science.
59. Lauersen, K.J., O. Kruse, and J.H. Mussnug, *Targeted expression of nuclear transgenes in Chlamydomonas reinhardtii with a versatile, modular vector toolkit*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(8): p. 3491-3503.
60. Fischer, N. and J.-D. Rochaix, *The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Molecular Genetics and Genomics, 2001. **265**: p. 888-894.
61. Plucinak, T.M., et al., *Improved and versatile viral 2 A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal, 2015. **82**(4): p. 717-729.
62. Taura, F., et al., *Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type Cannabis sativa*. FEBS letters, 2007. **581**(16): p. 2929-2934.
63. Dälken, B., et al., *Maltose-Binding Protein Enhances Secretion of Recombinant Human Granzyme B Accompanied by In Vivo Processing of a Precursor MBP Fusion Protein*. PLOS ONE, 2010. **5**(12): p. e14404.
64. Duong-Ly, K.C. and S.B. Gabelli, *Affinity Purification of a Recombinant Protein Expressed as a Fusion with the Maltose-Binding Protein (MBP) Tag*. Methods Enzymol, 2015. **559**: p. 17-26.
65. Azevedo, F., H. Pereira, and B. Johansson, *Colony PCR*, in *PCR*. 2017, Springer. p. 129-139.
66. Nouemssi, S.B., et al., *Rapid and efficient colony-PCR for high throughput screening of genetically transformed Chlamydomonas reinhardtii*. Life, 2020. **10**(9): p. 186.

67. Geissmann, Q., *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. PloS one, 2013. **8**(2).
68. Neupert, J., et al., *An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga Chlamydomonas*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-17.
69. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method*. methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
70. Schroda, M., C.F. Beck, and O. Vallon, *Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in Chlamydomonas*. The Plant Journal, 2002. **31**(4): p. 445-455.
71. Jinkerson, R.E. and M.C. Jonikas, *Molecular techniques to interrogate and edit the Chlamydomonas nuclear genome*. The Plant Journal, 2015. **82**(3): p. 393-412.
72. Zhang, R., et al., *High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA*. The Plant Cell, 2014. **26**(4): p. 1398-1409.
73. Geisler, K., et al., *Exploring the impact of terminators on transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii with a synthetic biology approach*. Life, 2021. **11**(9): p. 964.
74. Donnelly, M.L., et al., *The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins*. Journal of General Virology, 1997. **78**(1): p. 13-21.
75. Luke, G.A. and M.D. Ryan, *The 2A Story: The End of the Beginning*. Beyond the Blueprint-Decoding the Elegance of Gene Expression: Decoding the Elegance of Gene Expression, 2024: p. 115.
76. Zirpel, B., et al., *Optimization of Δ9-tetrahydrocannabinolic acid synthase production in Komagataella phaffii via post-translational bottleneck identification*. Journal of biotechnology, 2018. **272**: p. 40-47.
77. Geissler, M., et al., *Subcellular localization defines modification and production of Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid synthase in transiently transformed Nicotiana benthamiana*. Biotechnology letters, 2018. **40**: p. 981-987.

78. Zirpel, B., F. Stehle, and O. Kayser, *Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of Pichia (Komagataella) pastoris expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from Cannabis sativa L.* Biotechnology letters, 2015. **37**: p. 1869-1875.
79. Tran, N.T. and R. Kaldenhoff, *Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga Chlamydomonas reinhardtii.* Algal Research, 2020. **50**: p. 101986.
80. Kumar, A., V.R. Falcao, and R.T. Sayre, *Evaluating nuclear transgene expression systems in Chlamydomonas reinhardtii.* Algal research, 2013. **2**(4): p. 321-332.
81. Goold, H.D., J.L. Moseley, and K.J. Lauersen, *The synthetic future of algal genomes.* Cell Genomics, 2024.
82. Wichmann, J., et al., *Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (E)- α -bisabolene from the green microalga Chlamydomonas reinhardtii.* Metabolic engineering, 2018. **45**: p. 211-222.
83. Mayfield, S.P., et al., *Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories.* Current opinion in biotechnology, 2007. **18**(2): p. 126-133.
84. Zhang, Z., et al., *Efficient heterotrophic cultivation of Chlamydomonas reinhardtii.* Journal of Applied Phycology, 2019. **31**: p. 1545-1554.
85. Chung, K.P., et al., *Identification and characterization of the COPII vesicle-forming GTPase Sar1 in Chlamydomonas.* Plant Direct, 2024. **8**(6): p. e614.
86. Perozeni, F., et al., *Towards microalga-based superfoods: heterologous expression of zeolin in Chlamydomonas reinhardtii.* Frontiers in Plant Science, 2023. **14**: p. 1184064.
87. Rasala, B.A., et al., *Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae.* PloS one, 2014. **9**(4): p. e94028.
88. Dementyeva, P., et al., *A novel, robust and mating-competent Chlamydomonas reinhardtii strain with an enhanced transgene expression capacity for algal biotechnology.* Biotechnol Rep (Amst), 2021. **31**: p. e00644.
89. Shoyama, Y., et al., *Structure and function of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase, the enzyme controlling the psychoactivity of Cannabis sativa.* Journal of molecular biology, 2012. **423**(1): p. 96-105.

90. Aschern, M., et al., *A novel MoClo-mediated intron insertion system facilitates enhanced transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*, 2025. **16**: p. 1544873.
91. Jaeger, D., T. Baier, and K.J. Lauersen, *Intronserter, an advanced online tool for design of intron containing transgenes*. *Algal research*, 2019. **42**: p. 101588.
92. Lumbreras, V., D.R. Stevens, and S. Purton, *Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron*. *The Plant Journal*, 1998. **14**(4): p. 441-447.
93. Rose, A.B., *Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator*. *Frontiers in Genetics*, 2019. **9**(672).
94. Einhaus, A., et al., *Rational promoter engineering enables robust terpene production in microalgae*. *ACS Synthetic Biology*, 2021. **10**(4): p. 847-856.
95. Milito, A., et al., *Rational Design and Screening of Synthetic Promoters in Chlamydomonas reinhardtii*, in *Synthetic Promoters: Methods and Protocols*. 2024, Springer. p. 69-83.
96. Milito, A., et al., *Challenges and advances towards the rational design of microalgal synthetic promoters in Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*, 2023. **74**(13): p. 3833-3850.
97. Crozet, P., et al., *Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS synthetic biology*, 2018. **7**(9): p. 2074-2086.
98. Ghribi, M., et al., *Genome editing by CRISPR-Cas: a game change in the genetic manipulation of Chlamydomonas*. *Life*, 2020. **10**(11): p. 295.
99. López-Paz, C., et al., *Identification of Chlamydomonas reinhardtii endogenous genic flanking sequences for improved transgene expression*. *The Plant Journal*, 2017. **92**(6): p. 1232-1244.
100. Schroda, M., D. Blöcker, and C.F. Beck, *The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas*. *The plant journal*, 2000. **21**(2): p. 121-131.

IV. CHAPITRE 4: DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV. 1. Discussion

1. 1. Chapitre II - PCR de colonies rapide et efficace pour le criblage à haut débit de *Chlamydomonas reinhardtii* génétiquement transformé

La transformation nucléaire de *C. reinhardtii* par la méthode d'électroporation génère dans la plupart des cas, des milliers de transformants ou clones. Ce qui aboutit souvent à une efficacité de transformation qui peut varier entre 2×10^5 et 1×10^6 CFU/ μ g d'ADN linéaire (Shimogawara et al., 1998; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2021). Cependant, cet effectif pléthorique de clones générés présente des scénarios d'intégration des transgènes qui diffèrent d'un clone à l'autre au sein d'une même population de cellules transgéniques. Cette grande variabilité entre les transformants issus de la même lignée de cellules de microalgue génétiquement modifiées est principalement induite par des phénomènes d'intégration aléatoire des transgènes dans leur génome, et se caractérise par des processus de jonction non homologue des extrémités des transgènes, qui après transformation, peuvent être digérés par des endonucléases (Zhang et al., 2014). Comme conséquence, des bouts de la cassette d'expression sont aléatoirement intégrés à des positions différentes dans le génome, générant ainsi un nombre élevé de transformants qui résistent à la sélection aux antibiotiques sans pour autant contenir le gène d'intérêt, ou parfois ayant intégré juste une portion du gène d'intérêt. Cet ensemble de scénario rend le processus de sélection des clones très difficile et constitue à cet effet un des défis majeurs de l'expression nucléaire des transgènes chez *C. reinhardtii*.

Pour tenter de relever ce défi, Cao et al., ont développé une méthode de sélection des transformants par PCR sur colonies (cPCR) qui est connue comme une méthode de détection génétique très efficace lorsque le nombre d'échantillon à tester est raisonnable (Cao et al., 2009). Cette technique de référence présente divers avantages pour le criblage et la sélection de cellules génétiquement transformées. En ce qui concerne la transformation des microalgues, cette technique s'est avérée efficace et plus spécifique pour le criblage et la sélection de transgènes positifs dans plusieurs algues vertes génétiquement transformées telles que *C. reinhardtii* et *Chlorella pyrenoidosa* pour n'en citer que quelques-unes (Run et al., 2016). De plus, l'efficacité de cette technique a été démontrée dans plusieurs travaux impliquant le criblage ou la sélection de plusieurs autres

microorganismes à l'instar de *E. coli*, de *S. cerevisiae* et de certains champignons (Azevedo et al., 2017; Vijayaraman et al., 2016; Walch et al., 2016).

Dans le cadre de notre étude, la transformation nucléaire de *C. reinhardtii* par la méthode d'électroporation nous a permis d'obtenir une efficacité de 1×10^6 CFU/ μ g d'ADN plasmidique linéarisé. En effet, au bout de 5 à 7 jours d'incubation des transformants sur milieu de sélection TAP agar supplémenté de l'antibiotique hygromycine (Hyg) à une concentration finale de 10 μ g/mL, nous avons pu dénombrer plus de 7000 transformants (**Figure 2. 4 a**). Cependant, en raison de l'intégration aléatoire des transgènes dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, le fait que les transformants puissent se développer sur de la gélose TAP supplémentée en Hyg n'implique pas nécessairement que les clones aient également intégré le gène d'intérêt. Ainsi, il devient donc important de sélectionner un nombre élevé de clones pour augmenter les chances d'identifier des transformants qui pourraient avoir intégré une ou plusieurs copies du gène exogène d'intérêt, et présentent une expression transgénique élevée (Nour-Eldin et al., 2018).

De ce fait, dans le but de sélectionner des milliers de clones, nous avons optimisé une méthode de criblage à haut débit (HTS) basée sur le protocole standard de cPCR existant (Cao et al., 2009). Dans cette étude, nous avons montré que cette méthode de criblage ou de sélection HTS est plus facile, plus pratique et plus efficace pour tester et gérer un grand nombre de transformants, que ce soit pour un test cPCR, le chargement des échantillons sur gel d'agarose ou le maintien en culture des transformants. Notre méthode HTS a été comparée à la méthode de criblage standard (STS) basée sur la sélection et le maintien individuels, l'extraction d'ADN et la PCR des transformants clone par clone. Cette méthode HTS est non seulement rapide et efficace, mais aussi moins coûteuse et nécessite moins de temps de travail, contrairement à la méthode STS, qui est plus laborieuse lorsque le nombre de transformants à cribler devient important. En effet, des tests de comparaison de la méthode HTS développée par rapport à la méthode standard sur 96 clones, nous ont permis de démontrer que la méthode cPCR standard est clairement plus difficile à exécuter et nécessite plus de temps (**Tableau 2. 2**), contrairement à la méthode HTS qui est six fois plus rapide et rend le travail moins laborieux et moins coûteux en termes de temps, de matériel ou d'argent. De plus, l'utilisation de cette méthode nous a permis de réduire les erreurs pouvant survenir lors du travail avec des tubes individuels tout en augmentant la fiabilité du résultat, et par conséquent le nombre des clones positifs sélectionnés. Partant du même nombre de clones, le pourcentage de

clones positifs obtenus en utilisant la méthode HTS était de 48,3 %, contre 20 % pour la méthode standard.

Outre tous les avantages qu'offrent cette méthode HTS-PCR, elle se reflète positivement sur le plan écologique en raison de la réduction des consommables et du matériel utilisé qui pourraient être une menace pour l'environnement. Car la substitution des tubes Eppendorf et des tubes PCR individuels par des plaques de 96 puits, revient à utiliser moins de plastique. Par ailleurs, en utilisant cette approche, le maintien et le passage des clones sélectionnés d'une vieille gélose vers une nouvelle devient plus aisé, car 12 clones peuvent être transférés à la fois grâce à une pipette à multicanaux et organisé suivant le modèle d'une plaque de 96 puits (**Figure 2. 4 b**). Contrairement aux techniques de pointes de criblages basées sur la fluorescence des gènes rapporteurs qui nécessitent des outils plus sophistiqués et coûteux, notre méthode optimisée peut être appliquée dans les laboratoires ayant des ressources financières limitées.

Le développement de cette méthode est d'une très grande utilité pour la suite du projet, car nos transgènes n'étant pas fusionnés avec des gènes rapporteurs, l'exploiter permettra de sélectionner le maximum de transformants afin d'augmenter les chances d'identification de ceux ayant des niveaux d'expression des transgènes élevées.

1. 2. Chapitre III - Ingénierie métabolique de *Chlamydomonas reinhardtii* comme châssis pour la production de cannabinoïdes.

Dans l'optique de modifier métaboliquement la microalgue verte *C. reinhardtii* pour la production hétérologue des CBs, nous avons généré des constructions génétiques constituées de l'aromatique prényltransférase soluble doublement mutée (*NphB*_{G286S/Y288A}, qu'on appellera *NphB* pour la suite), issue de la souche CL190 de *Streptomyces sp.*, et de la *CBDAS* de *C. sativa*. Ces deux gènes sont impliqués dans les deux dernières étapes de la voie de biosynthèse des CBs qui aboutissent à la synthèse du CBGA et du CBDA, respectivement (**Figure 3.1**). Le choix de *NphB* dans la réalisation des constructions génétiques nous a permis de substituer l'*APT* ou le *CBGAS* transmembranaire de *C. sativa* dont l'intégration dans les systèmes hétérologues de production est difficile (Zirpel et al., 2017). Afin de tester la fonctionnalité des deux gènes après optimisation de leurs codons pour une expression nucléaire chez *C. reinhardtii*, nous avons réalisé leur expression dans la bactérie *E. coli* car c'est un système d'expression plus rapide que la microalgue. En effet, la construction bicistronique constituée de *NphB* lié par son extrémité C-terminal au *CBDAS* par un peptide auto clivable *FMDV2A* (*NphB-2A-CBDAS*) et la construction monocistronique constituée de *NphB*

seule ont été clonées dans le vecteur pMal c2x sous la régulation du promoteur tac et son terminateur. Le résultat de l'expression de *NphB* ou de la co-expression *NphB-2A-CBDAS* montre que les deux approches ont conduit à l'accumulation des protéines correspondantes dans *E. coli* (**Figure 3.2 B et C**). Compte tenu du fait que les gènes *CBDAS* et *THCAS* auraient la même origine évolutive et partageraient environ 83,9% d'acides aminés identiques dans leur séquence, avec des propriétés structurales et fonctionnelles similaires (Taura et al., 2007c), ce résultat diffère de ceux présentés dans la littérature où l'expression cytosolique et plastidique de la *THCAS* dans *E. coli* et *Nicotiana benthamiana*, respectivement, n'a pas conduit à la production de la protéine (Geissler et al., 2018; Zirpel et al., 2015). Ce contraste pourrait s'expliquer par la différence des éléments régulateurs tels que les promoteurs et terminateurs ou des vecteurs d'expressions utilisés, car dans les travaux de Zirpel et al., les vecteurs pET28a (+) et pET32a (+), ainsi que le promoteur T7 ont été utilisés (Zirpel et al., 2015). Les tests d'activités enzymatiques réalisés avec les protéines totales extraites des bactéries exprimant *NphB* ou co-exprimant *NphB-2A-CBDAS* ont conduit à la synthèse *in vitro* du CBGA à des concentrations de 193 ± 31 mg/L et de $2,3 \pm 0.1$ mg/L, respectivement (**Figure 3.2 B, C et E**). Ainsi, le *NphB* exprimé individuellement génère une meilleure activité par rapport à lorsqu'il est fusionné au CBDAS. Ces résultats montrent que la co-expression des deux gènes dans le même cadre de lecture affecterait négativement le niveau d'activité de l'enzyme NphB, corrélant ainsi ceux rapportés par Zirpel et al., dans la levure. En effet, ils ont démontré que la co-expression de *NphB* et *THCAS* dans *S. cerevisiae* sous un même cadre de lecture diminuait l'activité de l'enzyme NphB (Zirpel et al., 2017). Cependant, malgré l'accumulation de CBDAS dans la bactérie, nous n'avons pas pu détecter le CBDA après analyse des résultats de la réaction d'activité enzymatique *in vitro* réalisée dans les conditions optimales d'activité pour cet enzyme. Ce qui confirme ainsi les limites de l'exploitation du système procaryote pour l'expression hétérologue des oxydocyclases CBDAS et THCAS, qui ont besoin des modifications post-traductionnelles spécifiques pour leur fonctionnalité. En effet, le CBDAS produit par *E. coli* serait instable en raison d'une absence de glycosylation, d'un pH favorable permettant le bon repliement de la protéine tout en améliorant son activité, ou d'organelles (réticulum endoplasmique, vacuole) pouvant permettre une meilleure localisation de l'enzyme (Geissler et al., 2018; Schmidt et al., 2024; Zirpel et al., 2018a; Zirpel et al., 2018b; Zirpel et al., 2015). Ce qui suggère la nécessité d'un système d'expression eucaryote pouvant offrir des

modifications post-traductionnelles ou des choix d'organelle pour un potentiel adressage des protéines d'intérêt.

Les potentialités naturelles de la microalgue verte *C. reinhardtii* telles que la production des biomolécules à haute valeur ajoutée, la séquestration du CO₂, le temps de génération rapide et la facilité de sa culture à grande échelle, soulignent son potentiel en tant que plateforme biotechnologique pour la production durable de métabolites et de protéines recombinantes (Scaife et al., 2015; Specht et al., 2010; Tran et Kaldenhoff, 2020). Dans ce projet, nous avons exploité ce potentiel en modifiant métaboliquement cette microalgue pour la production hétérologue des CBs. Grâce à la méthode d'électroporation, nous avons intégré avec succès les transgènes constitués des constructions bicistroniques (C1, *NphB-2A-CBDAS*) et monocistroniques (C2, *NphB*; C3, *NphB* et C4, *CBDAS*) dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Dans les constructions C1, C2 et C4 (**Figure 3.3** et **S7**), l'expression des gènes est régulée par le promoteur constitutif fusionné *HSP70A/RBCS2* (*ARp*) et le terminateur 3'UTR/*RBCS2*. Cependant, l'intégration des transgènes dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii* est aléatoire et se fait via un processus de jonction non homologues des extrémités de l'ADN exogène. Ce qui aboutit donc à des populations hétérogènes de cellules transformées qui présentent différents niveaux d'intégration des transgènes et par conséquent une grande variabilité de l'expression de ces derniers. Ainsi, la croissance de plusieurs centaines de clones sur le milieu de sélection à l'antibiotique ne garantit pas l'intégration, ou l'expression des gènes exogènes (Jinkerson et Jonikas, 2015; Mussnug, 2017; Zhang et al., 2014). Pour faire face à un tel phénomène, nous avons sélectionné les transformants *NphB* et *CBDAS* de *C. reinhardtii* par la méthode de criblage par PCR sur colonies à haut débit (HTS) présenté dans le deuxième chapitre de ce document. Par cette méthode nous avons pu sélectionner 161 clones positifs qui contiennent les cassettes d'expression C1 (21 clones) et C2 (140 clones) dans leur intégralité c'est-à-dire promoteur-gènes d'intérêt-terminateur (**Tableau 3.1**). De ces résultats, nous avons noté une grande différence au niveau du nombre de clones positifs obtenus par PCR avec les cassettes C1 et C2, bien qu'étant partie du même nombre de clone (384 clones) sélectionné aléatoirement après transformation. Cette différence pourrait s'expliquer par l'influence de la taille du transgène sur le niveau d'intégration car chez *C. reinhardtii*, l'intégration des gros fragments d'ADN exogène dans le génome nucléaire est généralement entravée par des endonucléases. Ces enzymes digèrent l'ADN étranger de façon spécifique et génèrent des fragments incomplets de la cassette d'expression qui sont voués à la répression (Zhang et al., 2014).

L'intégration des transgènes dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii* étant aléatoire, la détection de la cassette d'expression dans son intégralité par PCR ne garantit pas nécessairement son expression. De ce fait, dans une même population de cellules transgéniques, le niveau d'expression des transgènes est très variable (Beauchemin et al., 2024; Kumar et al., 2013; Mussnug, 2017; Schroda, 2019). Dans cette étude, l'évaluation du niveau d'expression des transgènes *NphB* et *CBDAS* par RT-qPCR révèle la co-expression des deux gènes dans 57.1% des clones ayant intégrés la cassette bicistronique dans son intégralité. Par ailleurs, 83.3% des clones contenant la cassette monocistronique C2 ont exprimé *NphB* (**Tableau 3.1**). Cependant, malgré la fréquence élevée de l'expression des transgènes sous la régulation du promoteur *ARp*, une variation importante du niveau d'expression des gènes est observée dans les clones issus de la même lignée transgénique. Un résultat cohérent à ceux des travaux antérieurs qui montrent que le promoteur hybride *ARp* atteint des fréquences élevées de l'expression des transgènes en neutralisant la répression génique au niveau transcriptionnel chez *C. reinhardtii*. Ceci en raison de la présence de certains éléments régulateurs *cis* dans sa séquence, tels que des motifs de régulation du choc thermique 1 et 4, et de la boîte TATA (Lodha et al., 2008; Schroda et al., 2002; Strenkert et al., 2013). Bien que le promoteur *ARp/5'UTR* et le terminateur *3'UTR* aient régulé efficacement l'expression de *NphB* et *CBDAS*, nos résultats indiquent qu'ils n'ont pas conduit à la production des protéines cibles dans *C. reinhardtii*, ou du moins des quantités de protéines détectables par la technique de buvardage western (**Figure 3. 4A à B et S7 A à D**). Ce qui suggère une possible répression post-transcriptionnelle des transgènes *NphB* et *CBDAS*.

Il est rapporté dans la littérature que les mécanismes de répression des gènes se produisent aussi bien au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel chez *C. reinhardtii*. Au niveau transcriptionnel, ce phénomène est fortement médié par des facteurs protéiques qui modifient des histones spécifiques sur les nucléosomes au niveau des loci transgéniques pour déclencher la formation d'une structure de chromatine répressive, un mécanisme qui a peut-être évolué pour protéger le génome de l'invasion de l'ADN (Casas-Mollano et al., 2008; Cerutti et al., 1997; Neupert et al., 2009; Schroda, 2019; Shaver et al., 2010; Tran et Kaldenhoff, 2020). Cependant, la répression génique post-transcriptionnelle est généralement le résultat d'une conception inadéquate du transgène, c'est-à-dire lorsqu'aucun ou trop peu d'introns ont été insérés, que l'optimisation des codons usuels de *Chlamydomonas* n'a pas été respectée, ou lorsque les transgènes contiennent des répétitions inversées qui génèrent un ARN double brin (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018;

Barahimipour et al., 2015; Koblenz et Lechtreck, 2005; Yamasaki et al., 2008; Yamasaki et Ohama, 2011). Pour faire face à ces défis, les chercheurs ont conçu et développé plusieurs outils, tels que la création de nouvelles souches, l'amélioration des stratégies de conception de la cassette d'expression ainsi que des techniques d'insertion et le criblage du transgène, le développement des outils bio-informatiques qui facilitent l'intégration des introns dans le transgène et l'optimisation des éléments régulateurs comme le promoteur/5'UTR et le terminateur/3'UTR (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Beauchemin et al., 2024; Crozet et al., 2018; Jaeger et al., 2019; Kumar et al., 2013; Lumbreras et al., 1998; Mussnug, 2017; Neupert et al., 2009; Neupert et al., 2012; Nouemssi et al., 2020; Schroda, 2019; Schroda et al., 2002; Schroda et al., 2000).

Les défis liés à l'accumulation et la fonctionnalité de la protéine de *CBDAS* semble bien plus complexes que le problème de répression post-transcriptionnelle pouvant être associé aux promoteurs et terminateurs, ou à l'absence des introns dans sa séquence. En effet, l'accumulation des protéines de *CBDAS* et de *THCAS* fonctionnelles a été réalisé dans la levure grâce à leur localisation au niveau des vacuoles de la cellule. Un succès supporté par l'adressage des protéines dans le réticulum endoplasmique ou dans les vacuoles où elles sont glycosylées après la traduction, qui contribue fortement au repliement et à la stabilité de ces deux protéines. De plus, l'environnement vacuolaire offre un pH idéal pour les activités de ces enzymes (Bolaños-Martínez et al., 2022; Luo et al., 2019; Schmidt et al., 2024; Zirpel et al., 2018a; Zirpel et al., 2018b). Ainsi, les futures investigations de l'expression hétérologue de *CBDAS* dans *C. reinhardtii* devraient tenir compte de la localisation de la protéine recombinante dans le réticulum endoplasmique (RE) ou dans la vacuole pour favoriser son accumulation, sa stabilité et sa fonctionnalité. En revanche, compte tenu des observations faites de notre précédente investigation sur l'expression ou de la Co expression de *NphB* dans *E. coli*, l'échec de la production de *NphB* dans *C. reinhardtii* serait fortement influencé par les phénomènes de répression génique au niveau post-transcriptionnel. Car malgré l'optimisation de la séquence par rapport au génome nucléaire de *C. reinhardtii*, les facteurs tels que l'absence des introns, la souche de microalgue utilisée pour l'expression et les éléments régulateurs (promoteur et terminateur) peuvent impacter la production de la protéine recombinante (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Barahimipour et al., 2015; Geisler et al., 2021; Neupert et al., 2020; Neupert et al., 2009). De ce fait, nous avons opté d'optimiser l'expression de *NphB* dans différentes souches de *C. reinhardtii* sous la régulation du promoteur et terminateur *PSAD*.

Les chercheurs ont identifié les promoteurs *ARp* et *PSAD* comme de puissants promoteurs constitutifs dans le contexte transgénique de *Chlamydomonas* (Fischer et Rochaix, 2001; Schroda, 2019; Schroda et al., 2000). Cependant, des avis divergents par rapport à l'exploitation de l'un ou l'autre de ces promoteurs pour l'expression hétérologues des gènes dans *C. reinhardtii* ont été rapportés dans la littérature. Dans certains cas, le *PSAD* était plus efficace que le *ARp*, tandis que dans d'autres, l'inverse était vrai, et parfois, aucune différence significative n'était perceptible (Baier et al., 2018; Crozet et al., 2018; Heitzer et Zschoernig, 2007; Kumar et al., 2013; López-Paz et al., 2017; Onishi et Pringle, 2016). Schroda et al., ont rapporté que la performance de ces promoteurs dépend probablement de nombreux facteurs, tels que la nature des transgènes, leur longueur et leur position spatiale vis-à-vis des promoteurs. De plus, l'intégration dans la séquence du promoteur *AR* de l'intron *RBCS2* qui contient une séquence amplificatrice à proximité du site d'initiation de la traduction, ou de l'intron *RBCS1* dans le transgène régulé par le promoteur *PSAD*, pourrait stimuler l'activité de chacun des promoteurs (Baier et al., 2018; Schroda, 2019). Outre les promoteurs, les terminateurs ont un impact considérable sur l'expression du transgène. Des travaux antérieurs montrent que le terminateur *RBCS2/3'UTR* influence négativement l'expression du transgène et présente une activité régulatrice inférieure à celle du terminateur *PSAD* (Geisler et al., 2021; Kumar et al., 2013; Schroda, 2019).

Notre tentative visant à exprimer le gène *NphB* sous la régulation du promoteur et du terminateur *PSAD* dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii*, nous a permis de générer des transformants avec des niveaux d'expression de *NphB* et des fréquences d'accumulation de protéine élevées, à partir de la souche CC-125. En effet, des tests de buvardage western réalisés sur les clones PCR positifs sélectionnés à partir des transformant générés avec la souche CC-125, ont montré que la protéine d'intérêt était produite et accumulée dans 15 des 17 clones testés, soit une fréquence d'accumulation de 88,2 % (**Figure 3. 5 A et Tableau 3. 1**). De plus, nous avons observé que les transformants PCR positifs générés avec les souches CC-1690 et CC-5415 présentent des niveaux d'accumulation de la protéine NphB à des fréquences similaires à celles de CC-125 (**Figure 3. 5 A, B, C et Tableau 3. 1**). Ainsi, nos résultats révèlent que le promoteur et le terminateur *PSAD* ont efficacement régulé l'expression de *NphB* malgré l'absence d'introns dans sa séquence codante. Par ailleurs, ces résultats semblent indépendants des souches utilisées et témoignent la force d'activité régulatrice du promoteur et du terminateur *PSAD* dans l'expression de *NphB*. Ce qui est cohérent avec des travaux antérieurs qui rapporte que nativement chez *C. reinhardtii*, le promoteur

PSAD régule efficacement l'expression du gène *PSAD* qui ne possède pas d'intron dans sa séquence. En effet, ce gène dépourvu d'intron encode une protéine chloroplastique abondante située du côté stromal du complexe photosystème I (Fischer et Rochaix, 2001; Kumar et al., 2013). Les tests d'activité enzymatique *in vitro* réalisés à partir des extraits protéiques totaux issus des transformants exprimant *NphB*, nous a permis de confirmer la fonctionnalité de la protéine accumulée par les différentes souches de *C. reinhardtii*. Cette étape de l'expérience nous a permis non seulement, de justifier la reproductibilité de notre étude à travers la capacité de différentes souches de microalgue à accumuler une NphB active, mais aussi, de produire jusqu'à 633 ± 58 µg/L de CBGA *in vitro* avec une protéine recombinante de *C. reinhardtii*. De plus, cette étude constitue une première preuve de concept de l'exploitation de différentes souches de la microalgue verte pour la production hétérologue de CBGA. Ce qui suggère qu'une bonne optimisation des étapes de l'expression des autres gènes de la voies métabolique de biosynthèse des CBs pourra permettre de reconstruire toute cette voie biosynthétique dans *C. reinhardtii*, tout en ayant une flexibilité dans le choix des souches à exploitées. Cependant, l'expression de NphB dans *C. reinhardtii* a permis de générer une protéine active, mais avec un rendement de production de CBGA plus faible *in vitro* que lorsqu'elle était exprimée dans *E. coli*, plus tôt dans cette étude, ou par rapport à celle produite dans la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* (Fantino et al., 2024). Ces différences observées au niveau de l'activité de l'enzyme pourraient être liées à la faible accumulation de la protéine d'intérêt corrélée au niveau d'expression réduit du transgène dans la microalgue verte *C. reinhardtii*. En générale, l'intégration des transgènes sans intron dans le génome nucléaire de *C. reinhardtii* abouti le plus souvent à une expression inefficace, entraînant une accumulation très faible ou nulle des protéines correspondantes (Baier et al., 2020; Baier et al., 2018; Lumbreras et al., 1998). Ainsi, des étapes d'optimisation supplémentaires telles que l'ajout d'introns dans la séquence *NphB*, le test de différentes combinaison promoteur/terminateurs et l'optimisation des conditions de culture, contribueraient à améliorer le niveau d'expression du gène, tout en conduisant à une meilleure accumulation d'enzyme avec un rendement de synthèse de CBGA plus élevé.

Malgré l'activité enzymatique de NphB confirmée *in vitro* à partir d'extraits protéiques bruts issus de transformants positifs, la supplémentation des cultures avec l'acide olivétolique (OA) n'a pas conduit à la production de CBGA *in vivo*. Cette absence de production suggère une limitation potentielle de la disponibilité cytosolique du GPP, ou une faible assimilation, voire une non-

intégration du substrat OA par les cellules, possiblement en lien avec les conditions de culture, comme précédemment rapporté par Fantino et al. (Fantino et al., 2024).

Cependant, d'autres paramètres doivent également être considérés, notamment l'éventuelle toxicité des transgènes sur le cycle de croissance de la cellule hôte, ainsi que le niveau d'expression des transgènes au moment de la supplémentation en substrats ou de la collecte des cellules pour les analyses de détection des protéines et d'activité enzymatique.

L'évaluation de l'expression des transgènes au cours du temps (**Figure 4. 1A**), ainsi que leur impact sur la croissance cellulaire (**Figure 4. 1B**), a révélé que l'expression optimale était atteinte entre le cinquième et le sixième jour de culture à 25 °C, sous une photopériode de 16 h/8 h (jour/nuit). En outre, les courbes de croissance obtenues indiquent qu'il n'existe pas de différence significative entre les transformants, les souches contenant le vecteur vide (EV) et les souches sauvages non transformées.

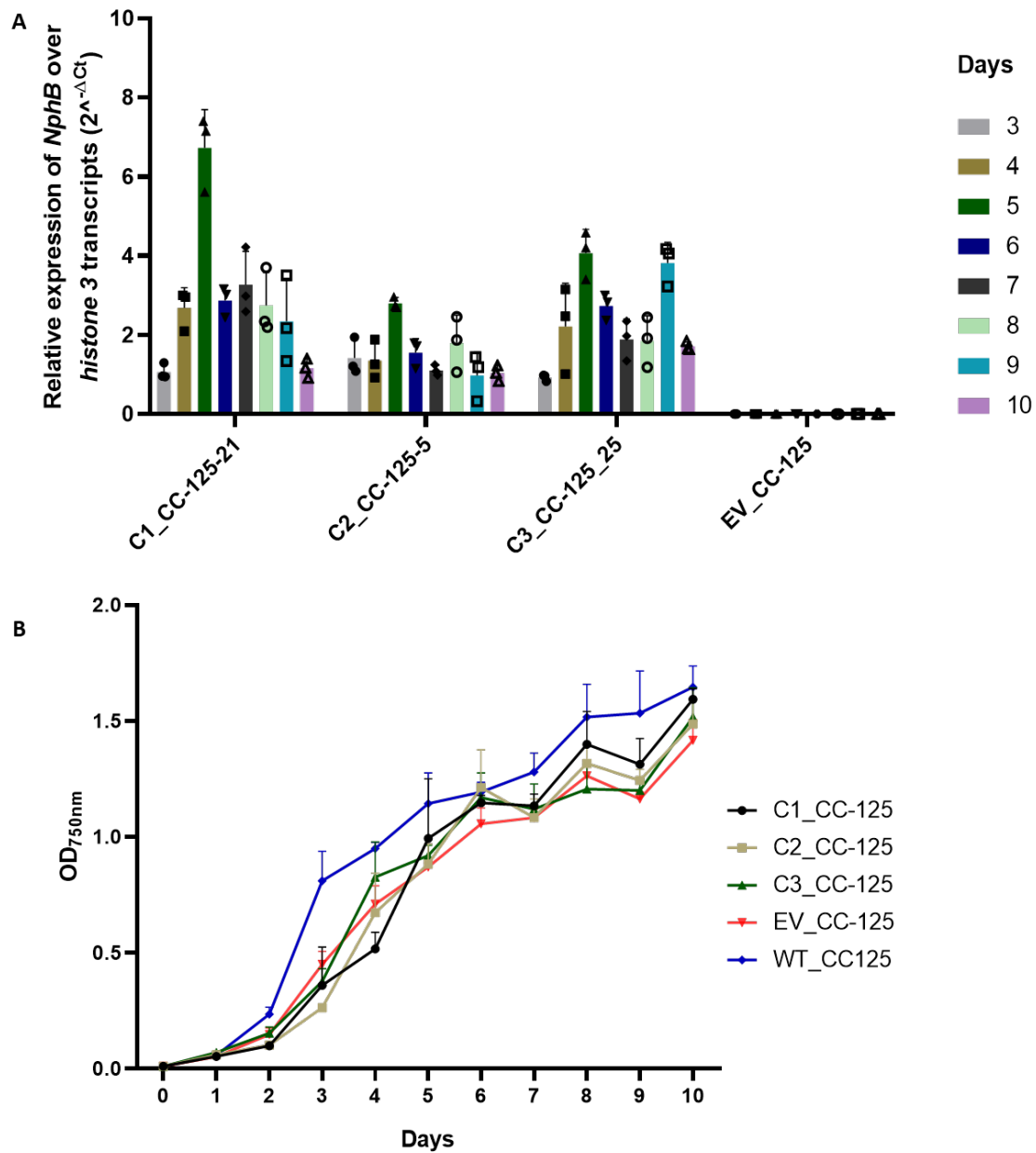


Figure 4. 1. Évaluation de l'expression des transgènes et de la croissance cellulaire au cours du temps chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

(A) Analyse du niveau d'expression du transgène *NphB* par RT-qPCR à différents jours de culture (J3 à J10) chez des clones transformants positifs, normalisée par rapport au gène de référence *histone H3*. L'expression maximale est observée entre le jour 5 et le jour 6. (B) Courbes de croissance des souches transformantes et de la souche sauvage (WT) cultivées dans un milieu TAP à 25 °C sous une photopériode de 16 h/8 h (jour/nuit). Aucune différence significative n'a été observée entre les transformants et le témoin non transformé, indiquant l'absence d'effet délétère des transgènes sur la croissance cellulaire. n=3, les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart type.

Ces résultats suggèrent que l'absence d'accumulation de CBGA *in vivo*, ou sa faible production *in vitro* dans certains clones, serait principalement liée à un niveau d'expression ou de traduction sous-optimal des transgènes, ainsi qu'à une disponibilité limitée des substrats dans *Chlamydomonas reinhardtii*, plutôt qu'à une éventuelle toxicité des transgènes intégrés dans la microalgue.

Ces défis pourraient être surmontés par la surexpression des gènes clés des voies du méthylérythritol-4-phosphate (MEP) et du mévalonate (MVA), afin d'augmenter la disponibilité intracellulaire du GPP, ou par l'élimination ciblée des voies métaboliques concurrentes utilisant le GPP comme substrat, à l'aide de techniques de génie génétique telles que CRISPR-Cas (Ghribi et al., 2020) (**Figure 3.1**). Par ailleurs, l'optimisation des conditions de culture, notamment la lumière, la température, la durée de croissance ou la densité cellulaire, pourrait également contribuer à améliorer le niveau d'expression du transgène et favoriser l'assimilation ou la diffusion des substrats à travers la membrane cellulaire. Une fois ces limitations surmontées, cela pourrait ouvrir la voie à une production efficace de CBGA *in vivo* dans *C. reinhardtii* et permettre de tirer pleinement parti de son potentiel en tant que plateforme photosynthétique pour la production hétérologue de cannabinoïdes.

En somme, cette étude apporte des connaissances précieuses sur l'ingénierie métabolique de *Chlamydomonas reinhardtii* pour la production hétérologue de cannabinoïdes, tout en mettant en évidence plusieurs facteurs susceptibles de limiter son exploitation à cette fin. Parmi ceux-ci figure l'utilisation du promoteur de fusion ARp (HSP70A/RBCS2) et de son terminateur, qui, dans notre étude, a conduit à une répression post-transcriptionnelle des transgènes, compromettant ainsi leur expression dans le génome nucléaire de la microalgue. Cette répression pourrait s'expliquer par l'absence d'introns dans les séquences codantes ou par une activité régulatrice insuffisante du terminateur associé. Ces résultats soulignent l'importance d'intégrer des introns artificiels ou natifs dans les transgènes afin d'améliorer l'efficacité de l'expression nucléaire. Par ailleurs, le choix des éléments régulateurs, notamment les combinaisons promoteur/terminateur, joue un rôle déterminant dans le succès de l'expression transgénique (Geissler et al., 2018; Schroda, 2019). Il est donc recommandé d'explorer diverses paires régulatrices afin d'identifier celles permettant d'atteindre des niveaux d'expression optimaux. Les recommandations et perspectives pour surmonter ces limitations et renforcer le potentiel de *C. reinhardtii* comme plateforme de production de cannabinoïdes sont présentées dans la section perspective suivante.

IV. 2. Conclusion

La microalgue verte *C. reinhardtii* est un organisme modèle dont le potentiel en tant que plateforme hétérologue pour la production de métabolites d'intérêt est désormais bien établi. De nombreuses études ont proposé des stratégies de co-expression de transgènes fusionnés à des gènes rapporteurs fluorescents, permettant de visualiser et de sélectionner les transformants exprimant les protéines d'intérêt. Toutefois, ces approches reposent sur des équipements de détection spécifiques, souvent limités aux laboratoires bien équipés, et peuvent présenter des inconvénients dans un contexte industriel, notamment en altérant la structure ou l'activité des protéines fusionnées.

Dans ce contexte, la méthode de criblage à haut débit par PCR sur colonies développée dans cette étude offre une alternative robuste, simple et accessible. Elle permet une sélection efficace des transformants positifs, sans nécessiter de systèmes de détection de fluorescence, et pourrait ainsi être appliquée à grande échelle dans des contextes de recherche comme de production industrielle. En ce qui concerne la biosynthèse des cannabinoïdes dans *C. reinhardtii*, peu de travaux ont exploré l'expression nucléaire de gènes exogènes complexes tels que *THCAS* ou *CBDAS*, dont la fonctionnalité dépend de leur localisation subcellulaire et de modifications post-traductionnelles spécifiques. Dans ce projet, nous avons réussi à produire du CBGA *in vitro* à partir d'extraits protéiques de transformants exprimant la prenyltransférase *NphB*. En revanche, bien que l'expression du transgène *CBDAS* ait été confirmée au niveau transcriptionnel, aucune accumulation de la protéine ni production de CBDA n'a été détectée. Les limitations potentielles expliquant cette absence, notamment celles liées à la stabilité de l'ARNm, à sa traduction ou à la localisation subcellulaire, ont été discutées en détail dans la section précédente.

IV. 3. Perspectives

Les limites identifiées dans le cadre de ce projet offrent des pistes concrètes pour orienter les futures stratégies d'ingénierie métabolique visant la production hétérologue de cannabinoïdes dans *C. reinhardtii*. Des considérations spécifiques doivent être prises en compte dans la conception des constructions génétiques, notamment la localisation subcellulaire des enzymes clés telles que CBDAS et THCAS. Diriger ces enzymes vers des compartiments intracellulaires propices à leur maturation et stabilité, tels que le réticulum endoplasmique ou la vacuole, pourrait améliorer leur accumulation et restaurer leur activité fonctionnelle (Bolaños-Martínez et al., 2022; Zirpel et al., 2018a).

Le choix des promoteurs et terminateurs, combiné à l'insertion d'introns dans les transgènes, reste un levier majeur pour contourner les phénomènes de répression post-transcriptionnelle fréquemment observés dans le noyau de *C. reinhardtii*. L'intégration de modules anti-*silencing*, l'utilisation de promoteurs synthétiques ou dérivés d'éléments natifs hautement actifs, ainsi que des terminateurs efficaces, devront être systématiquement évalués. La taille de la cassette d'expression doit également être optimisée pour maintenir une efficacité de transcription et de traduction élevée (Schroda, 2019; Zhang et al., 2014).

Par ailleurs, l'ingénierie du métabolisme central apparaît comme une étape cruciale. La surexpression ciblée des voies de biosynthèse des précurseurs clés, notamment les voies du méthylérythritol-4-phosphate (MEP), du mévalonate (MVA) et de l'acide hexanoïque, pourrait accroître la disponibilité du GPP, de l'hexanoyl-CoA, du malonyl-CoA et d'autres intermédiaires nécessaires à la synthèse des cannabinoïdes. En parallèle, l'inactivation de voies métaboliques compétitives consommant ces précurseurs pourrait canaliser efficacement les flux vers la voie cible. L'utilisation du système CRISPR-Cas ouvre ici des perspectives intéressantes pour des interventions génétiques précises et modulables (Ghribi et al., 2020).

Une piste complémentaire réside dans l'exploitation du génome chloroplastique de *C. reinhardtii*. En effet, le chloroplaste offre un environnement transcriptionnel et traductionnel favorable, dépourvu de *silencing* nucléaire, avec une capacité d'expression élevée et stable. L'intégration de certains modules de la voie cannabinoïde dans ce compartiment pourrait améliorer l'accumulation des enzymes, réduire la variabilité d'expression, et tirer avantage de la proximité directe avec les flux de métabolites issus de la photosynthèse.

De plus, les synthèses de cannabinoïde, comme CBDAS, CBCAS et THCAS, nécessitent la présence de cofacteurs spécifiques tels que le FAD pour être actives (Romero et al., 2020). Assurer une disponibilité suffisante de ces cofacteurs, ou optimiser leur liaison par ingénierie des domaines catalytiques, représentera une autre étape critique pour rétablir une activité enzymatique complète dans l'hôte algal.

En résumé, l'amélioration de la production des cannabinoïdes dans *C. reinhardtii* nécessitera une approche intégrée combinant :

- L'optimisation de l'expression des transgènes via l'ajout d'introns, l'usage de promoteurs/terminateurs performants, et des stratégies anti-*silencing* ;
- Le ciblage subcellulaire des enzymes vers des compartiments favorables à leur maturation et stabilité (RE, vacuole, ou chloroplaste) ;
- L'augmentation de la disponibilité des précurseurs (GPP, OA, CoA dérivés) par ingénierie des voies MEP/MVA et inhibition des voies concurrentes ;
- L'intégration fonctionnelle des cofacteurs essentiels tels que le FAD pour soutenir l'activité des synthèses oxydatives ;
- Et enfin, l'assemblage de modules multi-enzymatiques pour une reconstruction complète et efficace de la voie biosynthétique des cannabinoïdes *in vivo*.

Ces approches combinées pourraient faire de *C. reinhardtii* une plateforme photosynthétique performante et durable pour la production industrielle de cannabinoïdes.

IV. 4. Références

- Abd-Nikfarjam, B., Dolati-Somarin, A., Baradaran Rahimi, V., Askari, V. R., 2023. Cannabinoids in neuroinflammatory disorders: Focusing on multiple sclerosis, Parkinsons, and Alzheimers diseases. *Biofactors*. 49, 560-583.
- Abrams, D. I., 2018. The therapeutic effects of Cannabis and cannabinoids: An update from the National Academies of Sciences, Engineering and Medicine report. *European journal of internal medicine*. 49, 7-11.
- Advisory, M. I. R., Cannabis Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2024 - 2029). Vol. 2024, Mordor Intelligence, 2024.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A., 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of Cannabis sativa plants from different chemotypes. *Journal of natural products*. 79, 324-331.
- Al-Ghezi, Z. Z., Miranda, K., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S., 2019. Combination of cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol, ameliorates experimental multiple sclerosis by suppressing neuroinflammation through regulation of miRNA-mediated signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 10, 466430.
- Almaraz-Delgado, A. L., Flores-Urbe, J., Pérez-España, V. H., Salgado-Manjarrez, E., Badillo-Corona, J. A., 2014. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB express*. 4, 1-9.
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., Guerriero, G., 2016. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*. 7, 174167.
- Aschern, M., Braad, J., Milito, A., Alzuria, D., Yang, J.-S., 2025. A novel MoClo-mediated intron insertion system facilitates enhanced transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*. 16, 1544873.
- Atakan, Z., 2012. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic advances in psychopharmacology*. 2, 241-254.
- Awwad, F., Fantino, E. I., Héneault, M., Diaz-Garza, A. M., Merindol, N., Custeau, A., Gélinas, S.-E., Meddeb-Mouelhi, F., Li, J., Lemay, J.-F., 2023. Bioengineering of the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* with Cannabis Genes Enables the Production of the

- Cannabinoid Precursor, Olivetolic Acid. *International Journal of Molecular Sciences*. 24, 16624.
- Ayakar, S. R., Pawar, S. V., Hallam, S. J., Hossain, S., Yadav, V. G., SRIVASTAVA, S. K., Metabolic Engineering of *E. coli* for the Biosynthesis of Cannabinoid Products. Google Patents, 2020.
- Azevedo, F., Pereira, H., Johansson, B., 2017. Colony PCR. *PCR*. Springer, pp. 129-139.
- Bafana, A., 2013. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate polymers*. 95, 746-752.
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., Aria, M., 2019. Yeast expression systems: overview and recent advances. *Molecular biotechnology*. 61, 365-384.
- Baier, T., Jacobebbinghaus, N., Einhaus, A., Lauersen, K. J., Kruse, O., 2020. Introns mediate post-transcriptional enhancement of nuclear gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS genetics*. 16, e1008944.
- Baier, T., Wichmann, J., Kruse, O., Lauersen, K. J., 2018. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic acids research*. 46, 6909-6919.
- Barahimipour, R., Neupert, J., Bock, R., 2016. Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant molecular biology*. 90, 403-418.
- Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S. S., Bock, R., 2015. Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 84, 704-717.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., Wilton, S. D., 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences*. 69, 3613-3634.
- Beauchemin, R., Mérindol, N., Fantino, E., Lavoie, P., Nouemssi, S. B., Meddeb-Mouelhi, F., Desgagné-Penix, I., 2024. Successful reversal of transgene silencing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Journal*. 19, 2300232.
- Boer, P. H., Bonen, L., Lee, R. W., Gray, M. W., 1985. Genes for respiratory chain proteins and ribosomal RNAs are present on a 16-kilobase-pair DNA species from *Chlamydomonas*

- reinhardtii mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82, 3340-3344.
- Bolaños-Martínez, O. C., Malla, A., Rosales-Mendoza, S., Vimolmangkang, S., 2022. Harnessing the advances of genetic engineering in microalgae for the production of cannabinoids. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-12.
- Bolaños-Martínez, O. C., Urbanetz, A., Maresch, D., Strasser, R., Vimolmangkang, S., 2025. Engineering *Nicotiana benthamiana* for production of active cannabinoid synthases via secretory pathway optimization. *Biotechnology Reports*. 45, e00865.
- Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N., Heide, L., 2011. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PloS one*. 6, e27336.
- Cao, M., Fu, Y., Guo, Y., Pan, J., 2009. *Chlamydomonas* (chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma*. 235, 107-110.
- Carvalho, Â., Hansen, E. H., Kayser, O., Carlsen, S., Stehle, F., 2017. Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. *FEMS yeast research*. 17.
- Casas-Mollano, J. A., Jeong, B.-r., Xu, J., Moriyama, H., Cerutti, H., 2008. The MUT9p kinase phosphorylates histone H3 threonine 3 and is necessary for heritable epigenetic silencing in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 6486-6491.
- Center, C. R., Available online: <http://chlamycollection.org/>.
- Cerutti, H., Johnson, A. M., Gillham, N. W., Boynton, J. E., 1997. Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*. 9, 925-945.
- Chen, Y., Bi, C., Tong, S., Gong, Z., Hou, H., 2019. An improved and reliable method for microalgae direct PCR. *Journal of Applied Phycology*. 31, 2411-2421.
- Chung, K. P., Frieboese, D., Waltz, F., Engel, B. D., Bock, R., 2024. Identification and characterization of the COPII vesicle-forming GTPase Sar1 in *Chlamydomonas*. *Plant Direct*. 8, e614.
- Clinton, M., Cannabis Trichomes stock photo. iStock, 2019.
- Coelho, M. P., Duarte, P., Calado, M., Almeida, A. J., Reis, C. P., Gaspar, M. M., 2023. The current role of cannabis and cannabinoids in health: A comprehensive review of their therapeutic potential. *Life Sciences*. 329, 121838.
- Crocq, M.-A., 2020. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in clinical neuroscience*. 22, 223-228.

- Crozet, P., Navarro, F. J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K. J., Pérez-Pérez, M.-E., Auroy, P., Gorchs Rovira, A., Sauret-Gueto, S., 2018. Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS synthetic biology*. 7, 2074-2086.
- Dälken, B., Jabulowsky, R. A., Oberoi, P., Benhar, I., Wels, W. S., 2010. Maltose-Binding Protein Enhances Secretion of Recombinant Human Granzyme B Accompanied by In Vivo Processing of a Precursor MBP Fusion Protein. *PLOS ONE*. 5, e14404.
- Dattatraya H. Dethe, R. D. E., Samarpita Mahapatra, Saikat Das and Vijay Kumar B., 2015. Protecting group free enantiospecific total syntheses of structurally diverse natural products of the tetrahydrocannabinoid family. *Chemical communications*. 51, 2871-2873.
- Degenhardt, F., Stehle, F., Kayser, O., 2017. The biosynthesis of cannabinoids. *Handbook of cannabis and related pathologies*. Elsevier, pp. 13-23.
- Dementyeva, P., Freudenberg, R. A., Baier, T., Rojek, K., Wobbe, L., Weisshaar, B., Kruse, O., 2021. A novel, robust and mating-competent *Chlamydomonas reinhardtii* strain with an enhanced transgene expression capacity for algal biotechnology. *Biotechnol Rep (Amst)*. 31, e00644.
- Demurtas, O. C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R., Giuliano, G., 2013. A *Chlamydomonas*-derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PloS one*. 8, e61473.
- Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-1949.
- Diamond, A., Diaz-Garza, A. M., Li, J., Slattey, S. S., Merindol, N., Fantino, E., Meddeb-Mouelhi, F., Karas, B. J., Barnabé, S., Desgagné-Penix, I., 2023. Instability of extrachromosomal DNA transformed into the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*. 70, 102998.
- Donini, M., Marusic, C., 2019. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems. *Biotechnology letters*. 41, 335-346.
- Donnelly, M. L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S., Ryan, M. D., 1997. The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *Journal of General Virology*. 78, 13-21.
- Dorbian, Global Legal Cannabis Market Expected To Reach \$58 Billion In 2028. *Forbes*, 2024.

- Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B., 2015. Affinity Purification of a Recombinant Protein Expressed as a Fusion with the Maltose-Binding Protein (MBP) Tag. *Methods Enzymol.* 559, 17-26.
- Dussy, F. E., Hamberg, C., Luginbühl, M., Schwerzmann, T., Briellmann, T. A., 2005. Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products. *Forensic science international.* 149, 3-10.
- Dutta, B., 2003. In vitro lethal efficacy of leaf extract of *Cannabis sativa* Linn on the larvae of *Chironomus samoensis* Edward: an insect of public health concern. *Indian journal of experimental biology.* 41, 1338-1341.
- Einhaus, A., Baier, T., Rosenstengel, M., Freudenberg, R. A., Kruse, O., 2021. Rational promoter engineering enables robust terpene production in microalgae. *ACS Synthetic Biology.* 10, 847-856.
- Einhaus, A., Steube, J., Freudenberg, R., Barczyk, J., Baier, T., Kruse, O., 2022. Engineering a powerful green cell factory for robust photoautotrophic diterpenoid production. *Metabolic Engineering.*
- El-Mekkawi, S. A., Hussein, H., El-Enin, S. A., El-Ibiari, N., 2019. Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products. *Bulletin of the National Research Centre.* 43, 1-9.
- ElSohly, M., Gul, W., 2014. Constituents of *Cannabis sativa*. *Handbook of cannabis.* 3, 187-188.
- Fantino, E., Awwad, F., Merindol, N., Garza, A. M. D., Gélinas, S.-E., Robles, G. C. G., Custeau, A., Meddeb-Mouelhi, F., Desgagné-Penix, I., 2024. Bioengineering *Phaeodactylum tricornutum*, a marine diatom, for cannabinoid biosynthesis. *Algal Research.* 103379.
- Fantino, E., Messaabi, A., Méridol, N., Awwad, F., Sene, N., Gélinas, S.-E., Custeau, A., Rhéaume, K.-L., Meddeb-Mouelhi, F., Desgagné-Penix, I., 2025. Extrachromosomal expression of functional *Cannabis sativa* cannabidiolic acid synthase in *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research.* 85, 103889.
- Fischer, N., Rochaix, J.-D., 2001. The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics.* 265, 888-894.
- Gagne, S. J., Stout, J. M., Liu, E., Boubakir, Z., Clark, S. M., Page, J. E., 2012. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109, 12811-12816.

- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., Merchant, S. S., 2015. *Chlamydomonas* genome resource for laboratory strains reveals a mosaic of sequence variation, identifies true strain histories, and enables strain-specific studies. *The Plant Cell*. 27, 2335-2352.
- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Strenkert, D., Purvine, S. O., Pellegrini, M., Merchant, S. S., 2018. High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *The Plant Journal*. 93, 545-565.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*. 86, 1646-1647.
- Geisler, K., Scaife, M. A., Mordaka, P. M., Holzer, A., Tomsett, E. V., Mehrshahi, P., Mendoza Ochoa, G. I., Smith, A. G., 2021. Exploring the impact of terminators on transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* with a synthetic biology approach. *Life*. 11, 964.
- Geissler, M., Volk, J., Stehle, F., Kayser, O., Warzecha, H., 2018. Subcellular localization defines modification and production of Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid synthase in transiently transformed *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnology letters*. 40, 981-987.
- Geissmann, Q., 2013. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PloS one*. 8.
- Gelvin, S., Heizmann, P., Howell, S. H., 1977. Identification and cloning of the chloroplast gene coding for the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 3193-3197.
- Ghribi, M., Nouemssi, S. B., Meddeb-Mouelhi, F., Desgagné-Penix, I., 2020. Genome editing by CRISPR-Cas: a game change in the genetic manipulation of *Chlamydomonas*. *Life*. 10, 295.
- Gomord, V., Fitchette, A. C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L., 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant biotechnology journal*. 8, 564-587.

- Goodenough, U. W., Heuser, J. E., 1985. The Chlamydomonas cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *The Journal of cell biology*. 101, 1550-1568.
- Goold, H. D., Moseley, J. L., Lauersen, K. J., 2024. The synthetic future of algal genomes. *Cell Genomics*.
- Gorman, D. S., Levine, R., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 54, 1665-1669.
- Gülck, T., Booth, J., Carvalho, Â., Khakimov, B., Crocoll, C., Motawia, M., Møller, B., Bohlmann, J., Gallage, N., 2020. Synthetic Biology of Cannabinoids and Cannabinoid Glucosides in Nicotiana benthamiana and Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Natural Products*. 83, 2877-2893.
- Gülck, T., Møller, B. L., 2020. Phytocannabinoids: origins and biosynthesis. *Trends in plant science*. 25, 985-1004.
- Hamel, L.-P., Paré, M.-È., Poirier-Gravel, F., Tardif, R., Comeau, M.-A., Lavoie, P.-O., langlois, A., Goulet, M.-C., D'Aoust, M.-A., Michaud, D., 2024. Expression of a constitutively active nitrate reductase increases SARS-CoV-2 Spike protein production in Nicotiana benthamiana leaves that otherwise show traits of senescence. *bioRxiv*. 2024.09. 23.614552.
- Hamel, P. P., Salinas-Giegé, T., Przybyla-Toscano, J., Caccamo, A., Subrahmanian, N., Rouhier, N., Drouard, L., Cardol, P., Gonzalez-Halphen, D., Remacle, C., 2022. Chapter 11 - The mitochondrion: from genome to proteome. In: Grossman, A. R., Wollman, F.-A., Eds.), *The Chlamydomonas Sourcebook (Third Edition)*. Academic Press, London, pp. 369-412.
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O., Appendino, G., 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*. 33, 1357-1392.
- Harris, E. H., 2001. Chlamydomonas as a model organism. *Annual review of plant biology*. 52, 363-406.
- Harris, E. H., 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1*. Academic press.
- Harris, E. H., Harrisduke, E. H., 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1*. Elsevier Science.

- Hazekamp, A., Ware, M. A., Muller-Vahl, K. R., Abrams, D., Grotenhermen, F., 2013. The medicinal use of cannabis and cannabinoids—an international cross-sectional survey on administration forms. *Journal of psychoactive drugs*. 45, 199-210.
- Heitzer, M., Zschoernig, B., 2007. Construction of Modular Tandem Expression Vectors for the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* Using the Cre/lox-System. *BioTechniques*. 43, 324-332.
- Hesami, M., Pepe, M., Alizadeh, M., Rakei, A., Baiton, A., Phineas Jones, A. M., 2020. Recent advances in cannabis biotechnology. *Industrial Crops and Products*. 158, 113026.
- Hill, T., Cascio, M. G., Romano, B., Duncan, M., Pertwee, R., Williams, C., Whalley, B., Hill, A., 2013. Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *British journal of pharmacology*. 170, 679-692.
- Holland, J., 2010. *The pot book: A complete guide to cannabis*. Simon and Schuster.
- Hossain, G. S., Saini, M., Miyake, R., Ling, H., Chang, M. W., 2020. Genetic Biosensor Design for Natural Product Biosynthesis in Microorganisms. *Trends in Biotechnology*.
- Huchelmann, A., Boutry, M., Hachez, C., 2017. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant physiology*. 175, 6-22.
- Hussain, T., Jeena, G., Pitakbut, T., Vasilev, N., Kayser, O., 2021. Cannabis sativa research trends, challenges, and new-age perspectives. *Iscience*. 24.
- Inc., N. E. B., Available online: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-thermopol-buffer-m0267>.
- INHESJ/OFDI, C. d. r., Une analyse comparée des expériences de régulation du cannabis (Colorado, État de Washington, Uruguay). INHESJ/OFDI 2017, pp. 76.
- InMed, Cannabinol 101: The Science of Cannabinol (CBN). Vol. 2024. InMed Pharmaceuticals, 2020.
- Jaeger, D., Baier, T., Lauersen, K. J., 2019. Intronserter, an advanced online tool for design of intron containing transgenes. *Algal research*. 42, 101588.
- Jinkerson, R. E., Jonikas, M. C., 2015. Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *The Plant Journal*. 82, 393-412.
- Kamble, P., Cheriyaundath, S., Lopus, M., Sirisha, V., 2018. Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 30, 1641-1653.

- Kearsey, L. J., Prandi, N., Karuppiyah, V., Yan, C., Leys, D., Toogood, H., Takano, E., Scrutton, N. S., 2020. Structure of the *Cannabis sativa* olivetol-producing enzyme reveals cyclization plasticity in type III polyketide synthases. *The FEBS Journal*. 287, 1511-1524.
- Keller, L. C., Romijn, E. P., Zamora, I., Yates, J. R., Marshall, W. F., 2005. Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Current Biology*. 15, 1090-1098.
- Kindle, K. L., 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 1228-1232.
- Kindle, K. L., Richards, K. L., Stern, D. B., 1991. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88, 1721-1725.
- Kindle, K. L., Sodeinde, O. A., 1994. Nuclear and chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: strategies for genetic manipulation and gene expression. *Journal of Applied Phycology*. 6, 231-238.
- Koblenz, B., Lechtreck, K.-F., 2005. The NIT1 Promoter Allows Inducible and Reversible Silencing of Centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*. 4, 1959-1962.
- Kong, F., Yamaoka, Y., Ohama, T., Lee, Y., Li-Beisson, Y., 2019. Molecular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*. 60, 1184-1196.
- Kong, F., Yamasaki, T., Kurniasih, S. D., Hou, L., Li, X., Ivanova, N., Okada, S., Ohama, T., 2015. Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains. *Journal of bioscience and bioengineering*. 120, 239-245.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., Jarvis, D. L., 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*. 23, 567-575.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E. L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*. 305, 567-580.
- Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S. S., Malasarn, D., 2011. A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 66, 770-780.

- Krupinska, K., Melonek, J., Krause, K., 2013. New insights into plastid nucleoid structure and functionality. *Planta*. 237, 653-664.
- Kumar, A., Falcao, V. R., Sayre, R. T., 2013. Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*. 2, 321-332.
- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J., Rajam, M. V., 2004. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 166, 731-738.
- Kuzuyama, T., Noel, J. P., Richard, S. B., 2005. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature*. 435, 983-987.
- Lai, M.-Y., Abdul-Majid, N., Lau, Y.-L., 2019. Identification of Host Proteins Interacting with *Toxoplasma gondii* SAG1 by Yeast Two-Hybrid Assay. *Acta parasitologica*. 64, 575-581.
- Lauersen, K. J., Baier, T., Wichmann, J., Wördenweber, R., Mussnug, J. H., Hübner, W., Huser, T., Kruse, O., 2016. Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolic engineering*. 38, 331-343.
- Lauersen, K. J., Berger, H., Mussnug, J. H., Kruse, O., 2013a. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of biotechnology*. 167, 101-110.
- Lauersen, K. J., Kruse, O., Mussnug, J. H., 2015. Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit. *Applied microbiology and biotechnology*. 99, 3491-3503.
- Lauersen, K. J., Vanderveer, T. L., Berger, H., Kaluza, I., Mussnug, J. H., Walker, V. K., Kruse, O., 2013b. Ice recrystallization inhibition mediated by a nuclear-expressed and-secreted recombinant ice-binding protein in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied microbiology and biotechnology*. 97, 9763-9772.
- Lauersen, K. J., Wichmann, J., Baier, T., Kampranis, S. C., Pateraki, I., Møller, B. L., Kruse, O., 2018. Phototrophic production of heterologous diterpenoids and a hydroxy-functionalized derivative from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolic engineering*. 49, 116-127.
- Le Gouill, C., Dery, C., 1991. A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids. *Nucleic acids research*. 19, 6655-6655.
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A., Fernández, E., 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *TRENDS in Biotechnology*. 22, 45-52.

- Leon, R., Fernandez, E., 2007. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae. Transgenic microalgae as green cell factories. Springer, pp. 1-11.
- Lewis, M. M., Yang, Y., Wasilewski, E., Clarke, H. A., Kotra, L. P., 2017. Chemical profiling of medical cannabis extracts. ACS omega. 2, 6091-6103.
- Li, N., Zhang, Y., Meng, H., Li, S., Wang, S., Xiao, Z., Chang, P., Zhang, X., Li, Q., Guo, L., 2019. Characterization of fatty acid exporters involved in fatty acid transport for oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology for Biofuels. 12, 1-12.
- Liang, Z., Xiong, L., Zang, Y., Tang, Z., Shang, Z., Zhang, J., Jia, Z., Huang, Y., Ye, X., Liu, H., 2024. Extraction Optimization and Anti-Tumor Activity of Polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. Marine Drugs. 22, 356.
- Lim, K. J. H., Hartono, Y. D., Xue, B., Go, M. K., Fan, H., Yew, W. S., 2022. Structure-Guided Engineering of Prenyltransferase NphB for High-Yield and Regioselective Cannabinoid Production. ACS Catalysis. 12, 4628-4639.
- Liu, C., Wu, G., Huang, X., Liu, S., Cong, B., 2012. Validation of housekeeping genes for gene expression studies in an ice alga *Chlamydomonas* during freezing acclimation. Extremophiles. 16, 419-425.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. methods. 25, 402-408.
- Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. K., Wong, D. C., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., Castellarin, S. D., Bohlmann, J., Page, J. E., Samuels, A. L., 2020. Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. The Plant Journal. 101, 37-56.
- Lodha, M., Schulz-Raffelt, M., Schroda, M., 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, 172-176.
- López-Paz, C., Liu, D., Geng, S., Umen, J. G., 2017. Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* endogenous genic flanking sequences for improved transgene expression. The Plant Journal. 92, 1232-1244.
- Luke, G. A., Ryan, M. D., 2024. The 2A Story: The End of the Beginning. Beyond the Blueprint- Decoding the Elegance of Gene Expression: Decoding the Elegance of Gene Expression. 115.

- Lumbreras, V., Stevens, D. R., Purton, S., 1998. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *The Plant Journal*. 14, 441-447.
- Luo, X., Reiter, M. A., d’Espaux, L., Wong, J., Denby, C. M., Lechner, A., Zhang, Y., Grzybowski, A. T., Harth, S., Lin, W., 2019. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*. 567, 123-126.
- Lupette, J., Benning, C., 2020. Human health benefits of very-long-chain polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Biochimie*. 178, 15-25.
- Malcata, F. X., Pinto, I. S., Guedes, A. C., 2018. *Marine Macro-and Microalgae: An Overview*. CRC Press.
- Masi, A., Leonelli, F., Scognamiglio, V., Gasperuzzo, G., Antonacci, A., Terzidis, M. A., 2023. *Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health. *Molecules*. 28, 1185.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346, 561-564.
- Mayfield, S. P., Manuell, A. L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., Marin-Navarro, J., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current opinion in biotechnology*. 18, 126-133.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318, 245-250.
- Milito, A., Alzuria, D., Aschern, M., McQuillan, J. L., Yang, J.-S., 2024. Rational Design and Screening of Synthetic Promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Synthetic Promoters: Methods and Protocols*. Springer, pp. 69-83.
- Milito, A., Aschern, M., McQuillan, J. L., Yang, J.-S., 2023. Challenges and advances towards the rational design of microalgal synthetic promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*. 74, 3833-3850.
- Molino, J. V. D., de Carvalho, J. C. M., Mayfield, S. P., 2018. Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: Expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*. *PloS one*. 13, e0192433.

- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365, 61-65.
- Mussgnug, J. H., 2017. Nuclear Transformation and Toolbox Development. *Chlamydomonas: Molecular Genetics and Physiology*. Springer, pp. 27-58.
- Neupert, J., Gallaher, S. D., Lu, Y., Strenkert, D., Segal, N. a., Barahimipour, R., Fitz-Gibbon, S. T., Schroda, M., Merchant, S. S., Bock, R., 2020. An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature communications*. 11, 1-17.
- Neupert, J., Karcher, D., Bock, R., 2009. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal*. 57, 1140-1150.
- Neupert, J., Shao, N., Lu, Y., Bock, R., 2012. Genetic transformation of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Transgenic Plants*. Springer, pp. 35-47.
- Nouemssi, S. B., Ghribi, M., Beauchemin, R., Meddeb-Mouelhi, F., Germain, H., Desgagné-Penix, I., 2020. Rapid and efficient colony-PCR for high throughput screening of genetically transformed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life*. 10, 186.
- Nour-Eldin, H. H., Specht, E. A., Ostrand, J., Hoang, K. T., Karunanithi, P. S., Mayfield, S. P., 2018. High-throughput system for quantifying and characterizing homologous recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*. 31, 167-172.
- Obradovic, I., Taiclet, A.-F., RAPPORTS La légalisation du cannabis aux États-Unis : Résultats de l'enquête ASTRACAN. Retours d'expériences et bilan dans trois juridictions (État de Washington, Oregon, Californie). OFDT, Observatoire française des drogues et des tendances addictives, 2024, pp. 67.
- Onishi, M., Pringle, J. R., 2016. Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 6, 4115-4125.
- Page, J., Boubakir, Z., Aromatic prenyltransferase from Cannabis. 2012. US 20120144523. 2018.
- Perozeni, F., Pivato, M., Angelini, M., Maricchiolo, E., Pompa, A., Ballottari, M., 2023. Towards microalga-based superfoods: heterologous expression of zeolin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*. 14, 1184064.
- Plucinak, T. M., Horken, K. M., Jiang, W., Fostvedt, J., Nguyen, S. T., Weeks, D. P., 2015. Improved and versatile viral 2 A platforms for dependable and inducible high-level

- expression of dicistronic nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 82, 717-729.
- Poulhazan, A., Arnold, A. A., Mentink-Vigier, F., Muszyński, A., Azadi, P., Halim, A., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Wang, T., Warschawski, D. E., Marcotte, I., 2024. Molecular-level architecture of *Chlamydomonas reinhardtii*'s glycoprotein-rich cell wall. *Nature Communications*. 15, 986.
- Prévost, L., Pourquoi produire des cannabinoïdes sans cannabis? , Vol. 2024. Bon Stock, 2024.
- Qian, S., Clomburg, J. M., Gonzalez, R., 2019. Engineering *Escherichia coli* as a platform for the in vivo synthesis of prenylated aromatics. *Biotechnology and bioengineering*. 116, 1116-1127.
- Rasala, B. A., Chao, S.-S., Pier, M., Barrera, D. J., Mayfield, S. P., 2014. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *PloS one*. 9, e94028.
- Rasala, B. A., Lee, P. A., Shen, Z., Briggs, S. P., Mendez, M., Mayfield, S. P., 2012. Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide.
- Rasala, B. A., Mayfield, S. P., 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis research*. 123, 227-239.
- Rattanapisit, K., Shanmugaraj, B., Manopwisedjaroen, S., Purwono, P. B., Siri wattananon, K., Khorattanakulchai, N., Hanittinan, O., Boonyayothin, W., Thitithanyanont, A., Smith, D. R., 2020. Rapid production of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) and spike specific monoclonal antibody CR3022 in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific reports*. 10, 17698.
- Romero, P., Peris, A., Vergara, K., Matus, J. T., 2020. Comprehending and improving cannabis specialized metabolism in the systems biology era. *Plant Science*. 298, 110571.
- Rosales-Mendoza, S., García-Silva, I., González-Ortega, O., Sandoval-Vargas, J. M., Malla, A., Vimolmangkang, S., 2020. The potential of algal biotechnology to produce antiviral compounds and biopharmaceuticals. *Molecules*. 25, 4049.
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T., Soria-Guerra, R. E., 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports*. 31, 479-494.

- Rose, A. B., 2019. Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator. *Frontiers in Genetics*. 9.
- Run, C., Fang, L., Fan, J., Fan, C., Luo, Y., Hu, Z., Li, Y., 2016. Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research*. 17, 196-201.
- Salomé, P. A., 2021. Build it, and they will shine: generating fluorescent sensors for H₂O₂ in a unicellular alga. *The Plant Cell*.
- Salomé, P. A., Merchant, S. S., 2019. A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *The Plant Cell*. 31, 1682-1707.
- Scaife, M. A., Nguyen, G. T., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K. E., Smith, A. G., 2015. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *The Plant Journal*. 82, 532-546.
- Schäfer, K. J., Aras, M., Boles, E., Kayser, O., 2024. Optimizing hexanoic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* for the de novo production of olivetolic acid. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 17, 141.
- Schillberg, S., Finern, R., 2021. Plant molecular farming for the production of valuable proteins—Critical evaluation of achievements and future challenges. *Journal of plant physiology*. 258, 153359.
- Schmidt, C., Aras, M., Kayser, O., 2024. Engineering cannabinoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*. 19, 2300507.
- Schroda, M., 2004. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynthesis research*. 82, 221-240.
- Schroda, M., 2019. Good news for nuclear transgene expression in *Chlamydomonas*. *Cells*. 8, 1534.
- Schroda, M., Beck, C. F., Vallon, O., 2002. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*. 31, 445-455.
- Schroda, M., Blöcker, D., Beck, C. F., 2000. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The plant journal*. 21, 121-131.
- Schroda, M., Rémacle, C., 2022. Molecular advancements establishing *Chlamydomonas* as a host for biotechnological exploitation. *Frontiers in Plant Science*. 13, 911483.

- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., Mayfield, S. P., 2015. *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*. 82, 523-531.
- Sene, N., Gonçalves dos Santos, K. C., Merindol, N., Gélinas, S.-E., Custeau, A., Awwad, F., Fantino, E., Meddeb-Mouelhi, F., Germain, H., Desgagné-Penix, I., 2025. Impact of heterologous expression of *Cannabis sativa* tetraketide synthase on *Phaeodactylum tricornutum* metabolic profile. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 18, 42.
- Shahar, N., Landman, S., Weiner, I., Elman, T., Dafni, E., Feldman, Y., Tuller, T., Yacoby, I., 2020. The Integration of Multiple Nuclear-Encoded Transgenes in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Results in Higher Transcription Levels. *Frontiers in Plant Science*. 10.
- Shang, L., Gaudreau, L., Martel, M., Michaud, D., Pepin, S., Gosselin, A., 2018. Effects of CO₂ enrichment, LED inter-lighting, and high plant density on growth of *Nicotiana benthamiana* used as a host to express influenza virus hemagglutinin H1. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 59, 637-648.
- Shanmugaraj, B., I. Bulaon, C. J., Phoolcharoen, W., 2020a. Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants*. 9, 842.
- Shanmugaraj, B., Rattanapisit, K., Manopwisedjaroen, S., Thitithanyanont, A., Phoolcharoen, W., 2020b. Monoclonal antibodies B38 and H4 produced in *Nicotiana benthamiana* neutralize SARS-CoV-2 in vitro. *Frontiers in plant science*. 11, 589995.
- Shaver, S., Casas-Mollano, J. A., Cerny, R. L., Cerutti, H., 2010. Origin of the polycomb repressive complex 2 and gene silencing by an E (z) homolog in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Epigenetics*. 5, 301-312.
- Sheu, D.-S., Wang, Y.-T., Lee, C.-Y., 2000. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*. 146, 2019-2025.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H., 1998. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*. 148, 1821-1828.
- Shoyama, Y., Tamada, T., Kurihara, K., Takeuchi, A., Taura, F., Arai, S., Blaber, M., Shoyama, Y., Morimoto, S., Kuroki, R., 2012. Structure and function of Δ 1-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase, the enzyme controlling the psychoactivity of *Cannabis sativa*. *Journal of molecular biology*. 423, 96-105.

- Shultz, Z. P., Lawrence, G. A., Jacobson, J. M., Cruz, E. J., Leahy, J. W., 2018. Enantioselective Total Synthesis of Cannabinoids A Route for Analogue Development. *Organic letters*. 20, 381-384.
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology*. 11, 7.
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y., Taura, F., 2004. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 39767-39774.
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., 2007. Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current pharmaceutical biotechnology*. 8, 237-243.
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S., Shoyama, Y., 2005. Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase, the Enzyme Controlling Marijuana Psychoactivity, is Secreted into the Storage Cavity of the Glandular Trichomes. *Plant and Cell Physiology*. 46, 1578-1582.
- Song, Y., Fahs, A., Feldman, C., Shah, S., Gu, Y., Wang, Y., Machado, R. F., Wunderink, R. G., Chen, J., 2013. A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. *Springerplus*. 2, 1-7.
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., Mayfield, S., 2010. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*. 32, 1373-1383.
- Stout, J. M., Boubakir, Z., Ambrose, S. J., Purves, R. W., Page, J. E., 2012. The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *The Plant Journal*. 71, 353-365.
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Schroda, M., 2013. Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic acids research*. 41, 5273-5289.

- Sun, M., Qian, K., Su, N., Chang, H., Liu, J., Shen, G., 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology letters*. 25, 1087-1092.
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., Trant, J. F., 2021. The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of cannabis research*. 3, 1-12.
- Tan, Z., Clomburg, J. M., Gonzalez, R., 2018. Synthetic pathway for the production of olivetolic acid in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. 7, 1886-1896.
- Taura, F., Dono, E., Sirikantaramas, S., Yoshimura, K., Shoyama, Y., Morimoto, S., 2007a. Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochemical and biophysical research communications*. 361, 675-680.
- Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., 1996. Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L.: Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 17411-17416.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., Morimoto, S., 2007b. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chemistry & biodiversity*. 4, 1649-1663.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., Morimoto, S., 2007c. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS letters*. 581, 2929-2934.
- Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Morimoto, S., 2009. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS letters*. 583, 2061-2066.
- Techonologies, I. D., Available online: <https://www.idtdna.com/>.
- Thiebot, P., Labat, L., 2021. Les différents usages du cannabis : approche adaptée du biologiste toxicologue. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2021, 31-39.
- Thomas, B., Van Deynze, A., Bradford, K., 2002. Production of therapeutic proteins in plants. UCANR Publications.

- Thomas, F., Schmidt, C., Kayser, O., 2020. Bioengineering studies and pathway modeling of the heterologous biosynthesis of tetrahydrocannabinolic acid in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104, 9551-9563.
- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., Mayfield, S. P., 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnology advances*. 41, 107536.
- Touw, M., 1981. The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs*. 13, 23-34.
- Tran, N. T., 2019. Metabolic Engineering of Ketocarotenoid Biosynthetic Pathway into the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Tran, N. T., Kaldenhoff, R., 2020. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*. 50, 101986.
- Tsai, C.-H., Wei, S.-C., Lo, H.-R., Chao, Y.-C., 2019. Baculovirus as versatile vectors for protein display and biotechnological applications. *Current issues in molecular biology*. 34, 231-256.
- Valizadehderakhshan, M., Shahbazi, A., Kazem-Rostami, M., Todd, M. S., Bhowmik, A., Wang, L., 2021. Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L.(Hemp). *Agriculture*. 11, 384.
- Valliere, M. A., Korman, T. P., Woodall, N. B., Khitrov, G. A., Taylor, R. E., Baker, D., Bowie, J. U., 2019. A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production. *Nature communications*. 10, 1-9.
- van Breemen, R. B., Muchiri, R. N., Bates, T. A., Weinstein, J. B., Leier, H. C., Farley, S., Tafesse, F. G., 2022. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *Journal of Natural Products*. 85, 176-184.
- van den Hoogen, N. J., Harding, E. K., Davidson, C. E., Trang, T., 2022. Cannabinoids in chronic pain: therapeutic potential through microglia modulation. *Frontiers in Neural Circuits*. 15, 816747.
- Vijayaraman, R. S., Ramaraj, V., Kindo, A. J., 2016. Direct colony polymerase chain reaction for rapid identification of yeasts isolated from blood specimen. *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*. 18, 91.
- Walch, G., Knapp, M., Rainer, G., Peintner, U., 2016. Colony-PCR is a rapid method for DNA amplification of hyphomycetes. *Journal of Fungi*. 2, 12.

- Wang, L., Yang, L., Wen, X., Chen, Z., Liang, Q., Li, J., Wang, W., 2019. Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Bioscience reports*. 39.
- Watson, E., San Diego start-up develops algae production platform capable of producing proteins found in bovine and human breast milk. Vol. 2025. FoodNavigator USA, 2018.
- Weiner, I., Atar, S., Schweitzer, S., Eilenberg, H., Feldman, Y., Avitan, M., Blau, M., Danon, A., Tuller, T., Yacoby, I., 2018. Enhancing heterologous expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by transcript sequence optimization. *The Plant Journal*. 94, 22-31.
- Wichmann, J., Baier, T., Wentnagel, E., Lauersen, K. J., Kruse, O., 2018. Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (E)- α -bisabolene from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolic engineering*. 45, 211-222.
- Wittkopp, T. M., 2018. Nuclear Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *BIO-PROTOCOL*. 8.
- Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H., 2013. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *Journal of bioscience and bioengineering*. 115, 691-694.
- Yamasaki, T., Miyasaka, H., Ohama, T., 2008. Unstable RNAi Effects Through Epigenetic Silencing of an Inverted Repeat Transgene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 180, 1927-1944.
- Yamasaki, T., Ohama, T., 2011. Involvement of Elongin C in the spread of repressive histone modifications. *The Plant Journal*. 65, 51-61.
- Yoshimatsu, K., Iida, O., Kitazawa, T., Sekine, T., Kojoma, M., Makino, Y., Kiuchi, F., 2004. Growth characteristics of *Cannabis sativa* L. cultivated in a phytotron and in the field. *Bulletin on Natural Instruction of Health Science*. 122, 16-20.
- Zhang, M.-P., Wang, M., Wang, C., 2021. Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. *Biochimie*. 181, 1-11.
- Zhang, R., Patena, W., Armbruster, U., Gang, S. S., Blum, S. R., Jonikas, M. C., 2014. High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA. *The Plant Cell*. 26, 1398-1409.

- Zhang, Y., Guo, J., Gao, P., Yan, W., Shen, J., Luo, X., Keasling, J. D., 2023. Development of an efficient yeast platform for cannabigerolic acid biosynthesis. *Metabolic Engineering*. 80, 232-240.
- Zhang, Z., Tan, Y., Wang, W., Bai, W., Fan, J., Huang, J., Wan, M., Li, Y., 2019. Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 31, 1545-1554.
- Zhao, M.-L., Cai, W.-S., Zheng, S.-Q., Zhao, J.-L., Zhang, J.-L., Huang, Y., Hu, Z.-L., Jia, B., 2022. Metabolic engineering of the isopentenol utilization pathway enhanced the production of terpenoids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Drugs*. 20, 577.
- Zirpel, B., Degenhardt, F., Martin, C., Kayser, O., Stehle, F., 2017. Engineering yeasts as platform organisms for cannabinoid biosynthesis. *Journal of biotechnology*. 259, 204-212.
- Zirpel, B., Degenhardt, F., Zammarelli, C., Wibberg, D., Kalinowski, J., Stehle, F., Kayser, O., 2018a. Optimization of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase production in *Komagataella phaffii* via post-translational bottleneck identification. *Journal of biotechnology*. 272, 40-47.
- Zirpel, B., Kayser, O., Stehle, F., 2018b. Elucidation of structure-function relationship of THCA and CBDA synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of biotechnology*. 284, 17-26.
- Zirpel, B., Stehle, F., Kayser, O., 2015. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Biotechnology letters*. 37, 1869-1875.
- Zou, S., Kumar, U., 2018. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 833.
- Zuardi, A. W., 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 28, 153-157.

ANNEXE A.

Our study used the following vector (Figure A1).

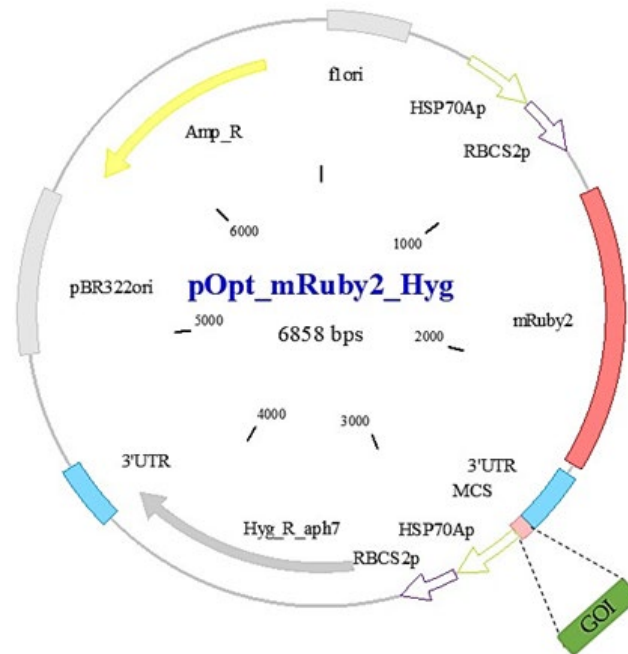


Figure A. 1. The recombinant Vector map.

Of pOpt_mRuby2_Hyg vector (Lauersen et al., 2015) containing Gene Of Interest (GOI). The vector map was made using Clone Manager suite 7 software.

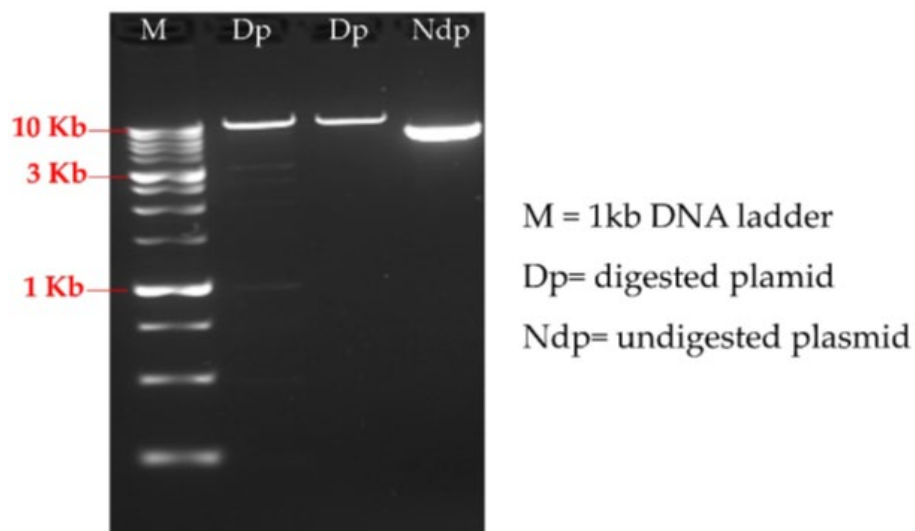


Figure A. 2. Linearized plasmid pOpt_mRuby2_Hyg containing the Gene of Interest. The restriction enzyme ScaI was used. The 1kb DNA ladder used is from FroggaBio (Concord, ON, Canada) Cat. DM010-R500

The results for the DNA concentration are displayed in Table A1.

Table A. 1. Genomic DNA concentration obtained after HT DNA extraction in a 96-well plate.

Here, we show an example of 48 DNA-extracted samples.

Sample Read#	Well ID	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
1	SPL1	A2	0.167	0.134	0.074	0.09	0.057	1.562	89.714
2	SPL2	A3	0.167	0.124	0.056	0.107	0.065	1.639	106.894
3	SPL3	B2	0.158	0.131	0.084	0.07	0.044	1.569	69.743
4	SPL4	B3	0.19	0.143	0.06	0.126	0.08	1.569	126.219
5	SPL5	C2	0.129	0.101	0.057	0.067	0.041	1.633	67.486
6	SPL6	C3	0.17	0.129	0.063	0.102	0.063	1.629	102.019
7	SPL7	D2	0.121	0.092	0.05	0.067	0.04	1.675	66.743
8	SPL8	D3	0.117	0.094	0.059	0.054	0.033	1.653	53.816
9	SPL9	E2	0.112	0.088	0.051	0.056	0.034	1.647	56.21
10	SPL10	E3	0.141	0.105	0.051	0.087	0.052	1.684	86.768
11	SPL11	F2	0.101	0.081	0.049	0.048	0.029	1.622	47.791
12	SPL12	F3	0.114	0.092	0.049	0.061	0.04	1.526	60.933
B	SPL13	G2	0.042	0.043	0.036	0	0	0	0
13	SPL1	A2	0.156	0.117	0.053	0.1	0.061	1.631	99.51
14	SPL2	A3	0.09	0.074	0.051	0.034	0.02	1.758	34.371
15	SPL3	B2	0.24	0.173	0.06	0.175	0.11	1.598	175.279
16	SPL4	B3	0.117	0.092	0.054	0.059	0.035	1.682	58.657
17	SPL5	C2	0.114	0.091	0.055	0.055	0.033	1.651	55.252
18	SPL6	C3	0.12	0.092	0.05	0.066	0.04	1.667	65.907
19	SPL7	D2	0.393	0.279	0.07	0.317	0.205	1.549	317.437
20	SPL8	D3	0.103	0.082	0.049	0.05	0.03	1.63	49.642
21	SPL9	E2	0.1	0.081	0.051	0.044	0.027	1.66	44.324
22	SPL10	E3	0.104	0.082	0.047	0.053	0.032	1.677	53.017
23	SPL11	F2	0.145	0.111	0.057	0.083	0.051	1.624	82.756
24	SPL12	F3	0.164	0.143	0.106	0.054	0.034	1.604	54.168

Table A1. *Cont.*

Sample Read#	Well ID	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
B	SPL13	G2	0.045	0.042	0.039	0	0	0	0
25	SPL1	A2	0.118	0.093	0.049	0.066	0.041	1.593	65.524
26	SPL2	A3	0.122	0.094	0.051	0.067	0.04	1.666	67.201
27	SPL3	B2	0.174	0.126	0.05	0.12	0.074	1.63	119.823
28	SPL4	B3	0.259	0.191	0.068	0.186	0.119	1.562	186.418
29	SPL5	C2	0.233	0.169	0.054	0.174	0.111	1.566	174.01
30	SPL6	C3	0.132	0.102	0.051	0.077	0.048	1.587	76.95
31	SPL7	D2	0.071	0.061	0.046	0.022	0.013	1.751	21.983
32	SPL8	D3	0.114	0.09	0.055	0.055	0.033	1.672	54.91
33	SPL9	E2	0.072	0.061	0.044	0.024	0.014	1.723	24.317
34	SPL10	E3	0.083	0.067	0.044	0.034	0.02	1.689	34.399
35	SPL11	F2	0.145	0.114	0.065	0.076	0.046	1.637	75.822
36	SPL12	F3	0.105	0.084	0.049	0.053	0.033	1.618	52.875
B	SPL13	G2	0.042	0.041	0.038	0	0	0	0
37	SPL1	A2	0.116	0.093	0.05	0.063	0.041	1.547	63.025
38	SPL2	A3	0.277	0.201	0.062	0.21	0.136	1.545	209.66
39	SPL3	B2	0.15	0.114	0.051	0.095	0.06	1.577	95.231
40	SPL4	B3	0.354	0.259	0.064	0.286	0.192	1.49	285.522
41	SPL5	C2	0.216	0.163	0.061	0.151	0.098	1.532	150.736
42	SPL6	C3	0.113	0.088	0.045	0.064	0.04	1.602	64.316
43	SPL7	D2	0.206	0.155	0.057	0.145	0.096	1.517	144.948
44	SPL8	D3	0.327	0.241	0.074	0.248	0.164	1.514	247.814
45	SPL9	E2	0.177	0.135	0.058	0.114	0.074	1.547	113.956
46	SPL10	E3	0.154	0.118	0.051	0.099	0.065	1.53	98.815
47	SPL11	F2	0.381	0.282	0.097	0.277	0.18	1.538	276.991
48	SPL12	F3	0.157	0.118	0.052	0.101	0.063	1.609	100.925

B = The bold raw represents blank negative control (distilled water)

Our study used the following master mix preparation (Table A2).

Table A. 2. Reaction master mix preparation.
(source NEB builder(Inc.)).

Component	25 μ L reaction	Final Concentration
10X ThermoPol Reaction Buffer	2.5 μ l	1X
10 mM dNTPs	0.5 μ l	200 μ M
10 μ M Forward Primer mix (PGK/GOI)	0.5 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
10 μ M Reverse Primer mix (PGK/GOI)	0.5 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
10X Loading Dye Buffer	1 μ l	0.4X
Template DNA	2 μ l	<1,000 ng
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.125 μ l	1.25 units/50 μ l PCR
Nuclease-free water	To 25 μ l	

ANNEXE B

SUPPLEMENTARY FIGURES

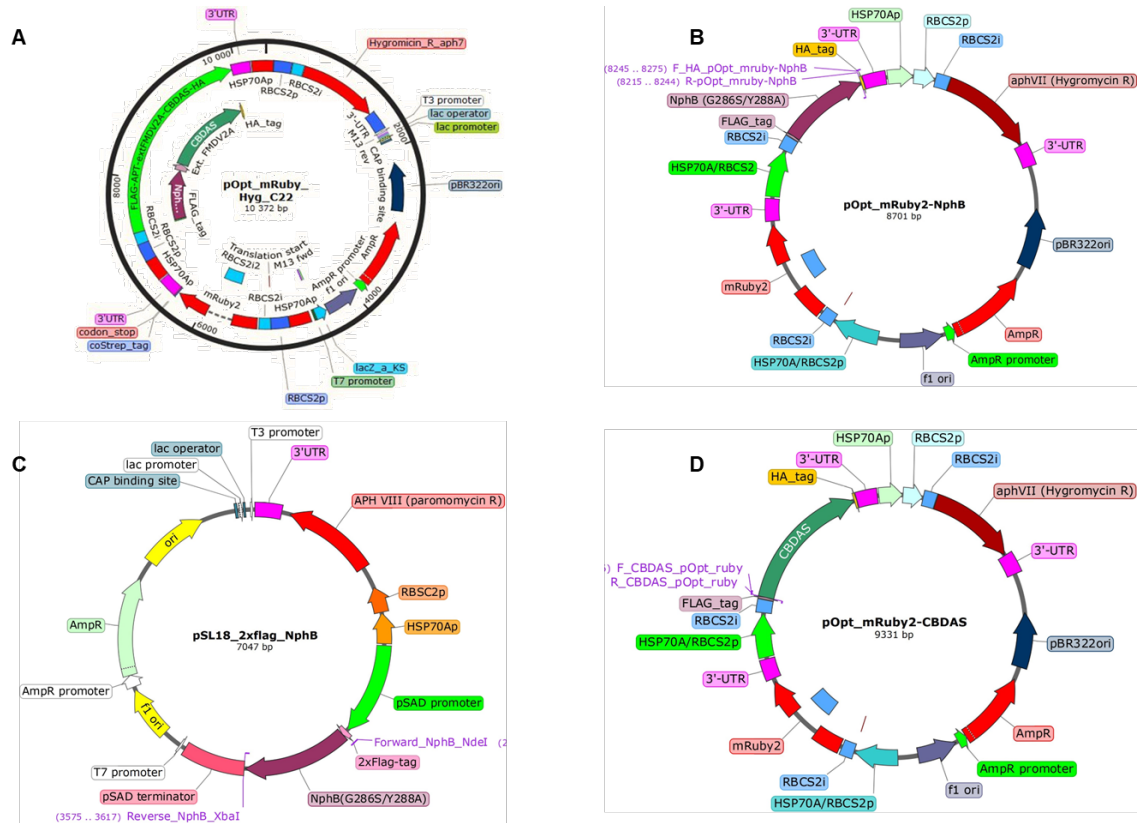


Figure S. 1. Recombinant vectors used for *C. reinhardtii* nuclear transformation.

pOpt_mRuby2-aphVII and pSL18-aphVIII harboring, A) the bicistronic constructs C1, of NphB-2A-CBDAS under ARp regulation; B) the monocistronic construct C2, of NphB under ARp regulation; C) the monocistronic construct C3, of NphB under pSAD regulation; D) the monocistronic construct C4, of CBDAS under ARp regulation. The vector design was created using SnapGene.

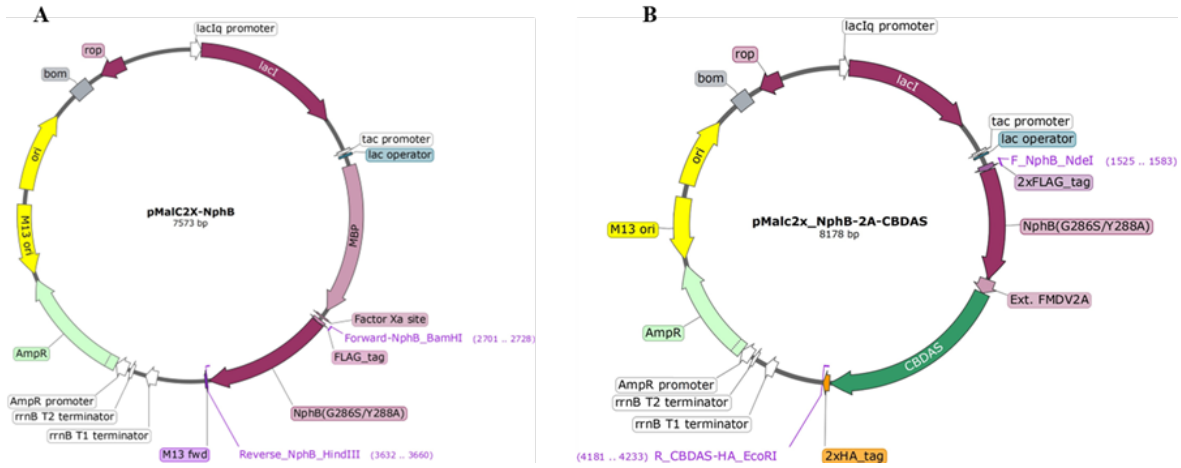


Figure S. 2. Recombinant vectors *E. coli* transformation.

pMal-c2x harboring NphB and CBDAS genes for expression in *E. coli*. A) pMalc2x holds the monocistronic genetic construct (*NphB*) fused to the C-terminal region of maltose binding protein (*MBP*), B) pMalc2x holds the bicistronic genetic construct (*NphB-2A-CBDAS*) without *MBP*.

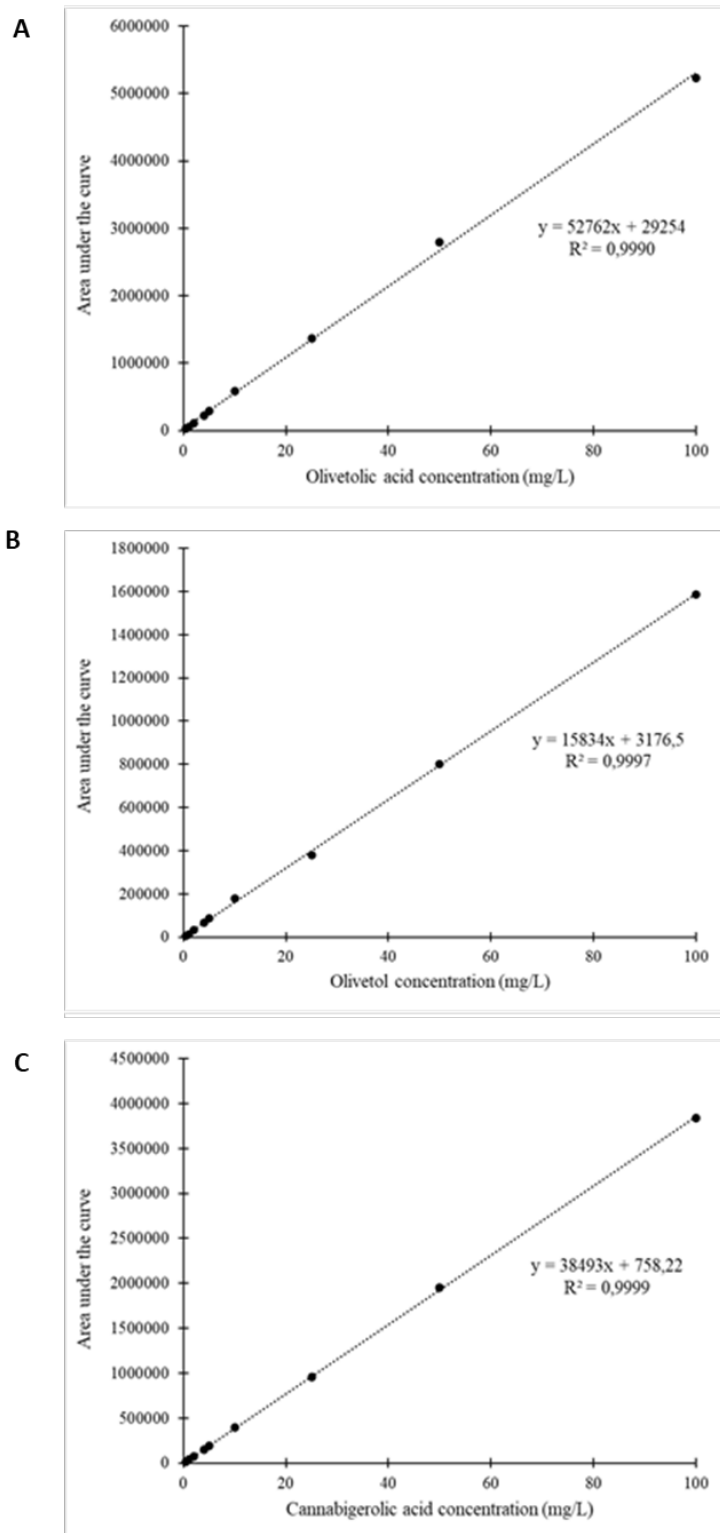


Figure S. 3. Calibration curves used for sample analysis by HPLC-DAD.
A) Olivetolic acid, B) Olivetol, and C) Cannabigerolic acid.

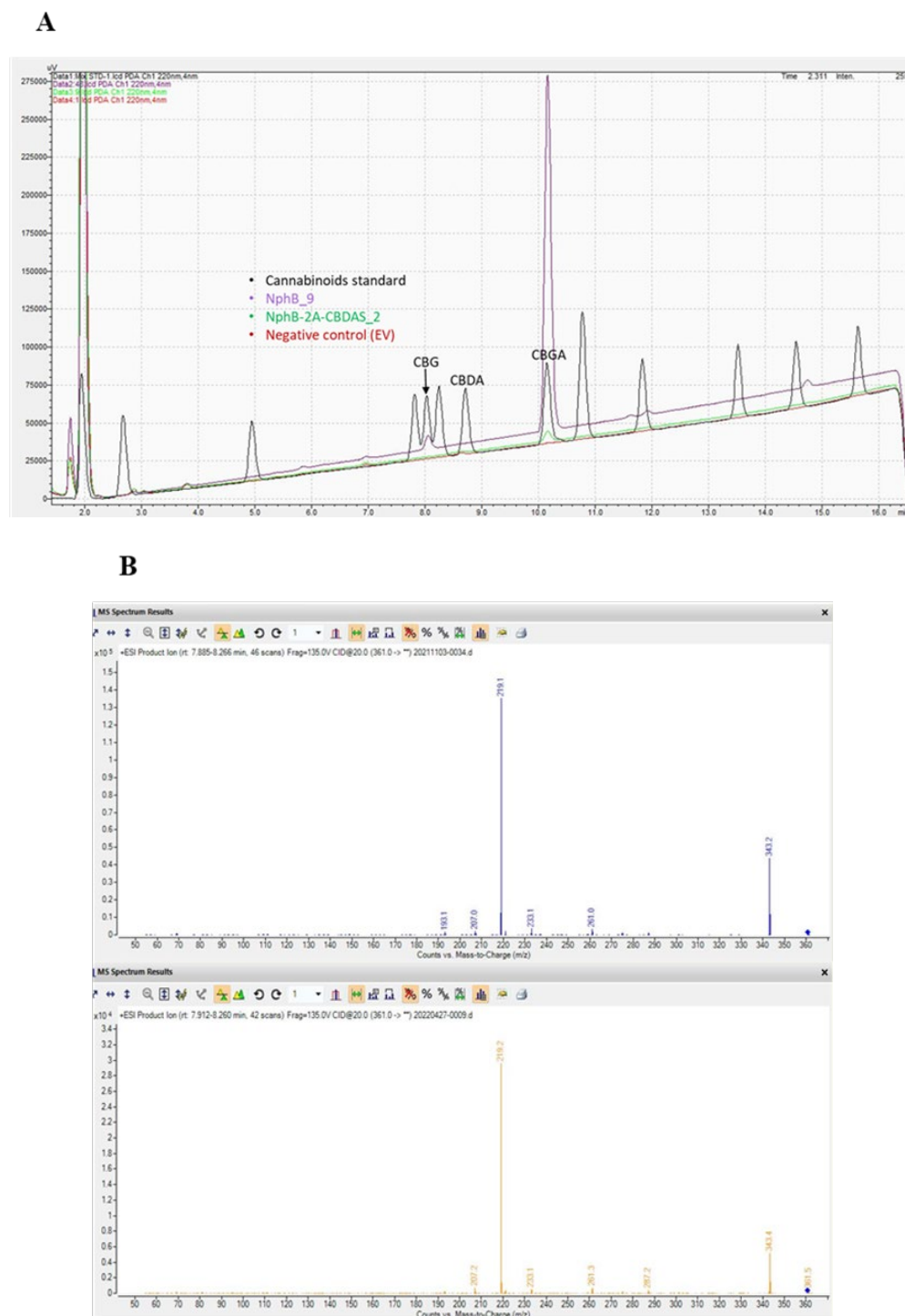


Figure S. 4. Chromatograms of samples analyzed after *in vitro* enzymatic assay. A) the detection of CBGA at the retention time of 10.146 min when the single protein NphB (peak in purple) or the fused protein NphB-2A-CBDAS (peak in green) was used, with no peak matching the CBDA standard (in black), compared to the empty vector (EV) used (in red); B) Confirmation of CBGA mass-to-charge (m/z) produced *in vitro* using NphB-2A-CBDAS protein compared to the CBGA standard.

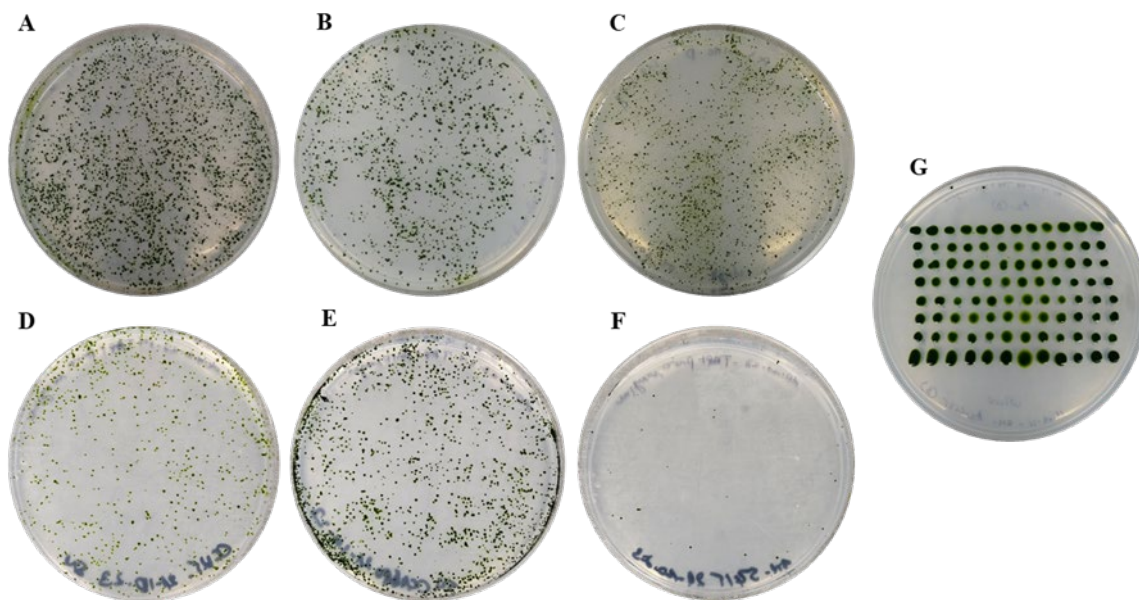
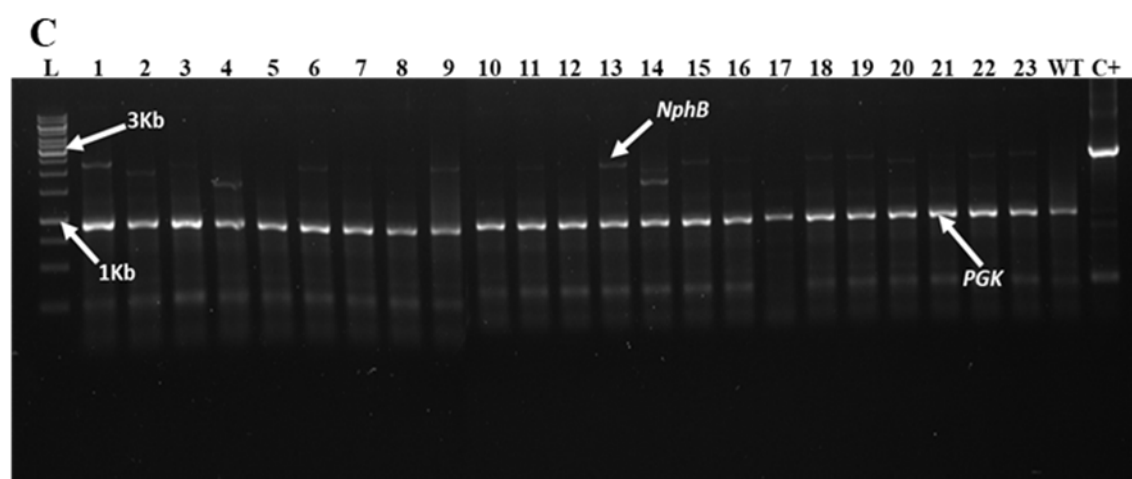
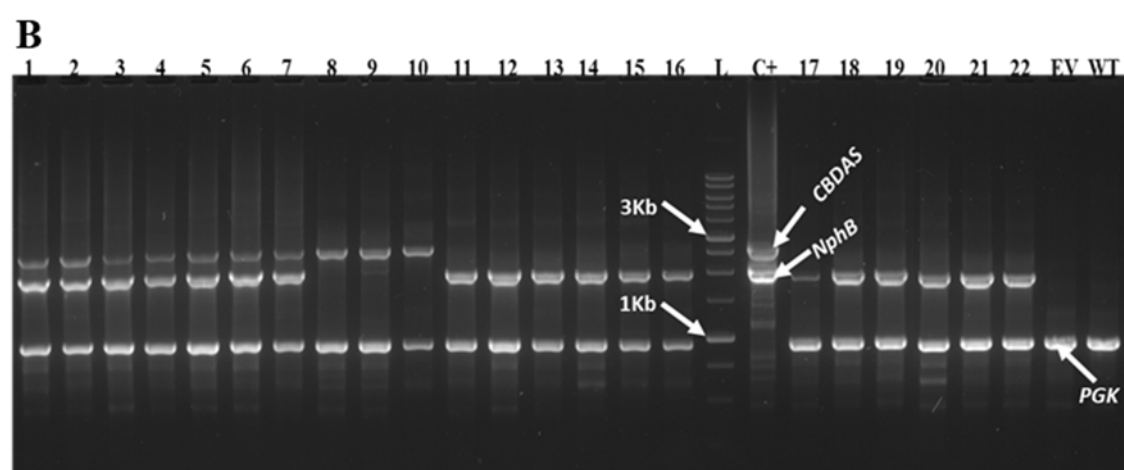
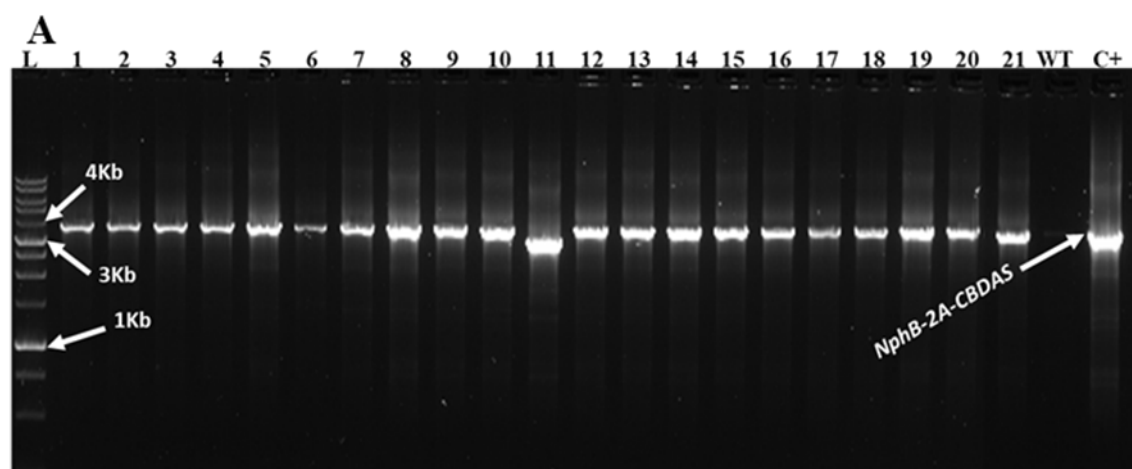


Figure S. 5. Colonies obtained after the nuclear transformation of *C. reinhardtii*. *C. reinhardtii* wild-type strains transformed by electroporation and a layout of transformants randomly selected on a TAP-hygromycin or paromomycin selection plate. (A) Strain CC-125 transformed with C1, (B) Strain CC-125 transformed with C2, (C) Strain CC-125 co-transformed with C2+C4, (D) Strain CC-125 transformed with C3, (E) Strain CC-1690 transformed with C3, (F) Strain CC-5415 transformed with C3, (G) an example of transformants selected growing on TAP media selection plate in a layout of 96 wells plate for high throughput sub-culturing and colony PCR screening. All the strains were transformed with an equal amount of the digested linearized and purified recombinant DNA (2 μ g).



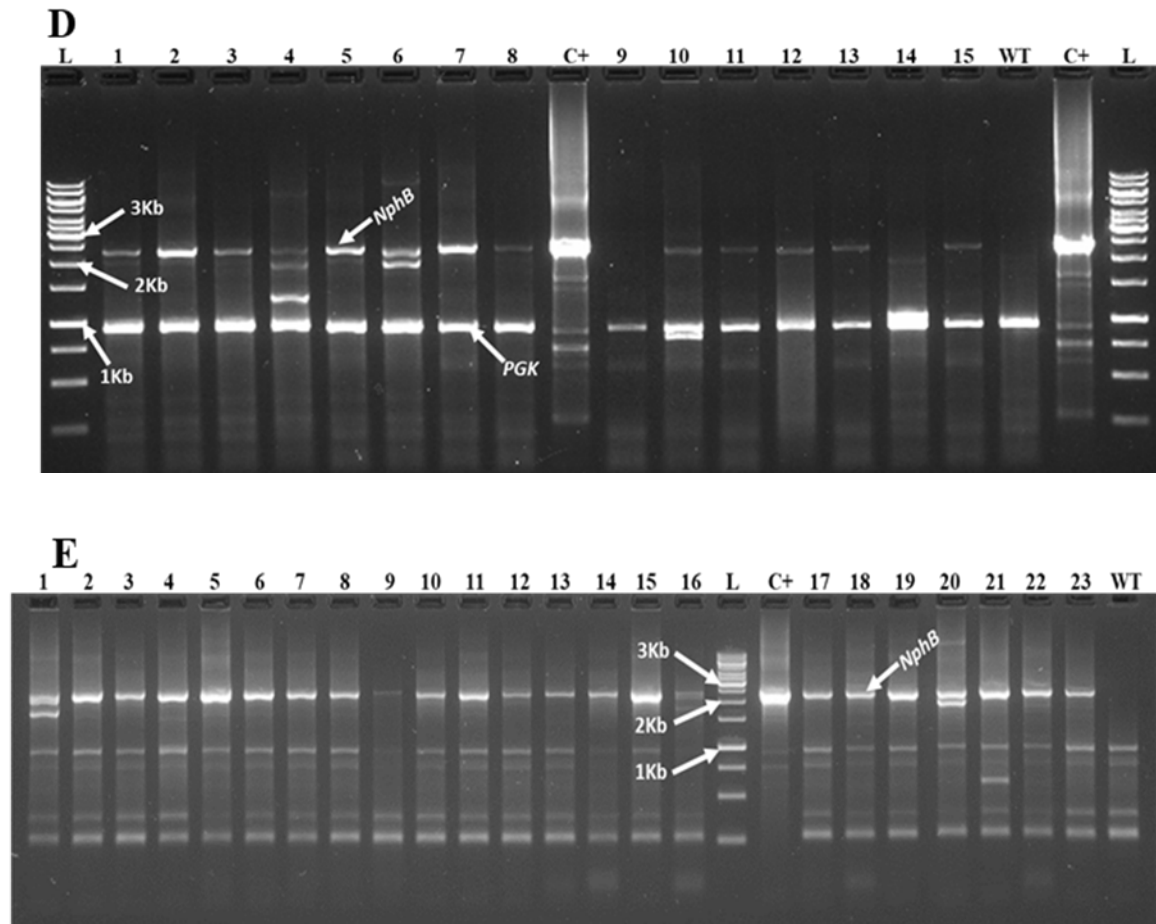


Figure S. 6. Illustration of 1% agarose gels showing transgenes amplicons after PCR screening of the selected transformants.

(A) C1 amplicons of 3.5 kb from CC-125 transformants, (B) An example of C2 and C4 amplification of 2.577 kb and 1.950 kb amplicons, respectively, from CC-125 transformants, (C) C3 amplicons of 2.363 kb from CC-125 transformants, (D) C3 amplicons of 2.363 kb from CC-5415 transformants, and (E) C3 amplicons of 2.363 kb from CC-1690 transformants. PCR products were run for 45 to 60 min at 100 V constant, and positive control (C+) used was the purified recombinant plasmid DNA of the corresponding construct in each case. The gene PGK (Phosphoglycerate Kinase: amplicon size 0.944 kb) was used as an internal control for gDNA extraction in the high throughput colony PCR experiments. L: Frogga Bio 1 Kb DNA ladder; WT: wild-type strains.

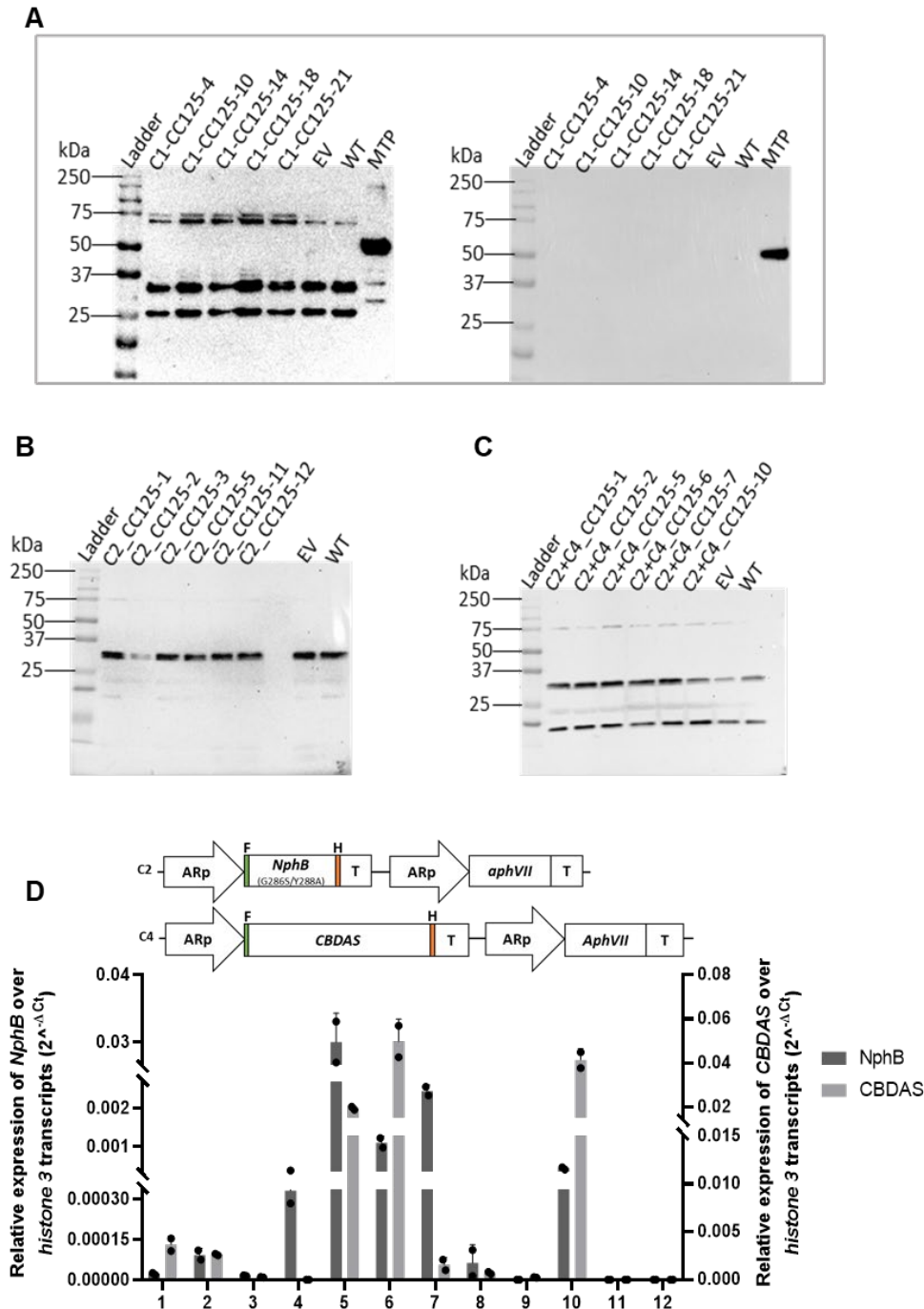


Figure S. 7. *C. reinhardtii* PCR-positive transformants characterization for the expression of the transgene.

C. reinhardtii strain CC-125 transformed or co-transformed with the genetic constructs C1, C2, and C4 successfully expressed or co-expressed the transgenes *NphB* and *CBDAS* but did not yield the expected proteins. A) Western blot showing unspecific bands detection (left panel) onto the membrane containing separated protein from transformants expressing C1 when treated with Flag antibody; on the right panel is the membrane treated with HA antibody,

which shows no band, except the multi-tag purified protein(MTP) used as a positive control for the experiment; **B)** Expressed NphB protein extracts after Western blot analysis showing unspecific bands after treatment with flag antibody; **C)** NphB and CBDAS expression levels in transformants obtained from the Co-transformation of genetic constructs C2 and C4; **D)** Co-expressed *NphB* and *CBDAS* protein extracts after Western blot analysis, shows unspecific bands when the membrane was treated with the flag antibody. The expected sizes of proteins of interest are C1 $\approx$ 100 kDa or $\approx$ 37 kDa and $\approx$ 60 kDa (if the ribosome-skip mediated by 2A occurs), C2 $\approx$ 37 kDa, and C4 $\approx$ 60 kDa.

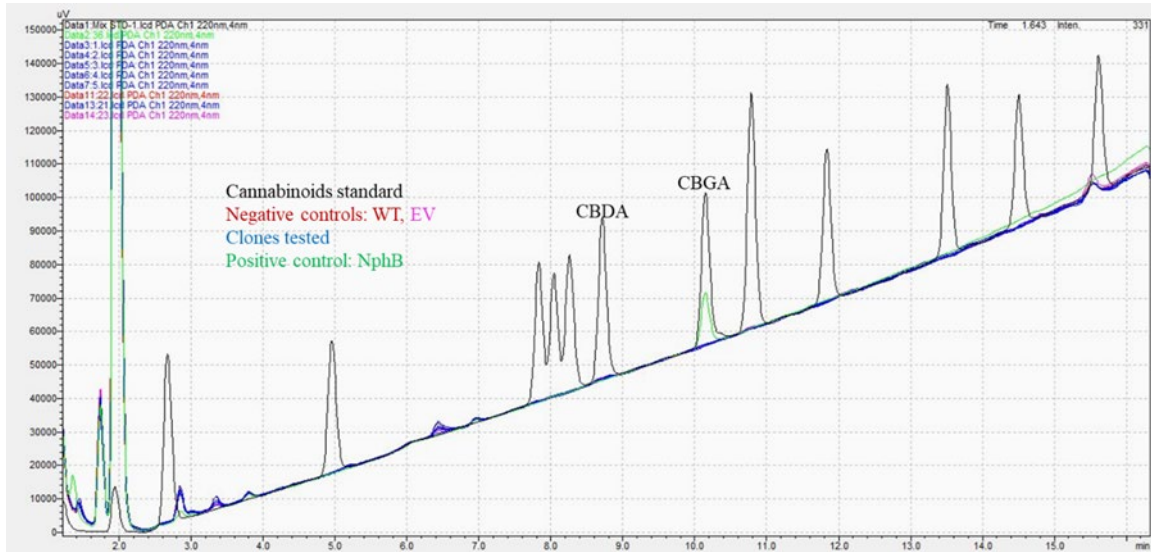


Figure S. 8. HPLC-DAD analysis of *in vitro* enzymatic assay samples generated with the *C. reinhardtii* expressing C1 transgènes.

Chromatograms showing no detection of CBGA or CBDA in clones tested (in blue), compared to the positive control (*NphB* expressed in *E. coli*), which shows the CBGA peak at a retention time of 10.146 min (in green) matching the commercial standard CBGA peak (in black) after analysis by HPLC-DAD of invitro enzymatic products obtained from the reaction performed with the total proteins of the *C. reinhardtii* clones expressing *NphB*-2A-*CBDAS*. Chromatograms of clones tested showed a similar profile as the negative controls (wild type (WT) in red and empty vector (EV) in pink).

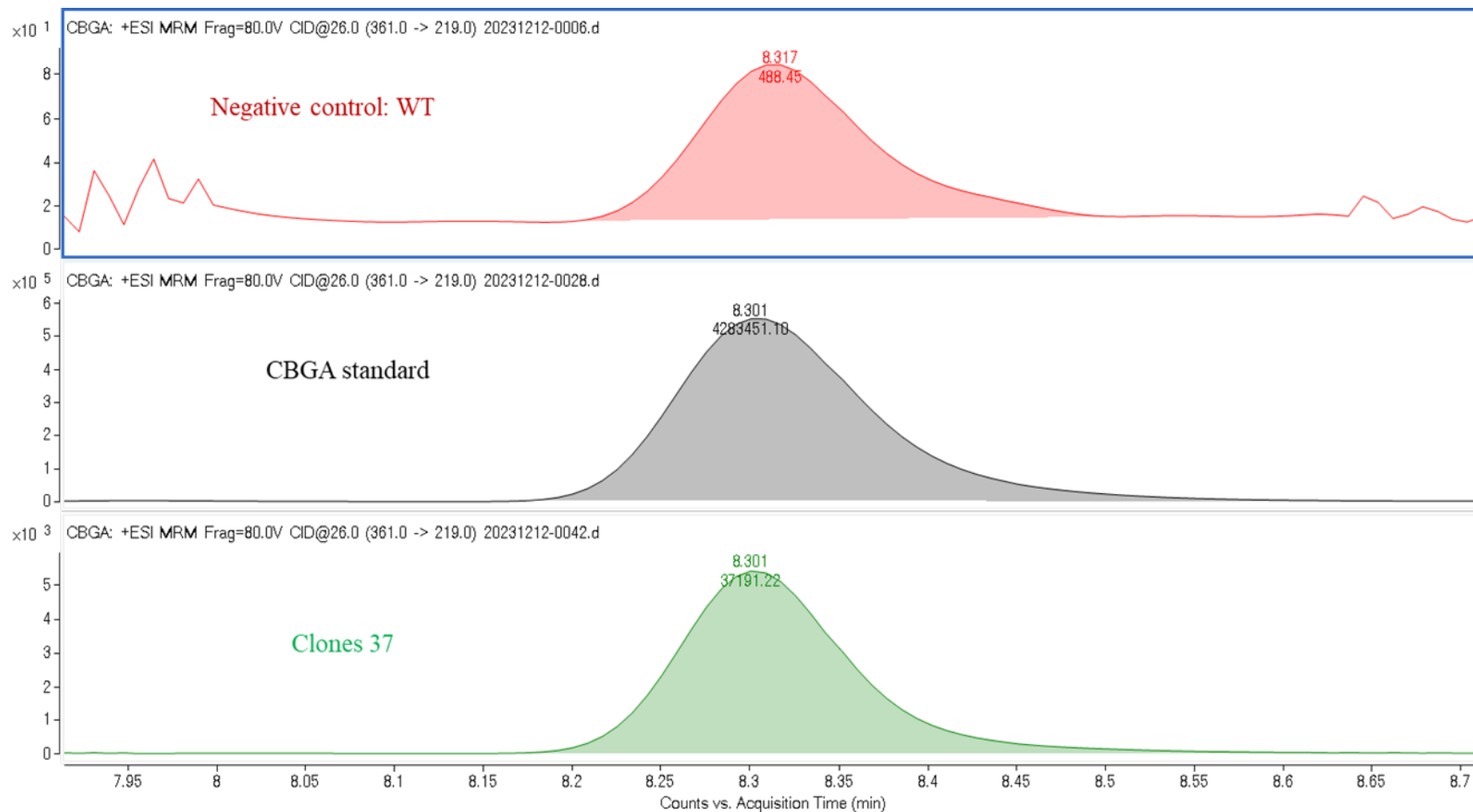


Figure S. 9. Example of CBGA signal detection by HPLC-MS/MS for a *C. reinhardtii* clone expressing NphB. The CBGA was detected at the retention of 8.301 min in the positive clone (green) compared to the CBGA standard (black) and the negative control WT (red).

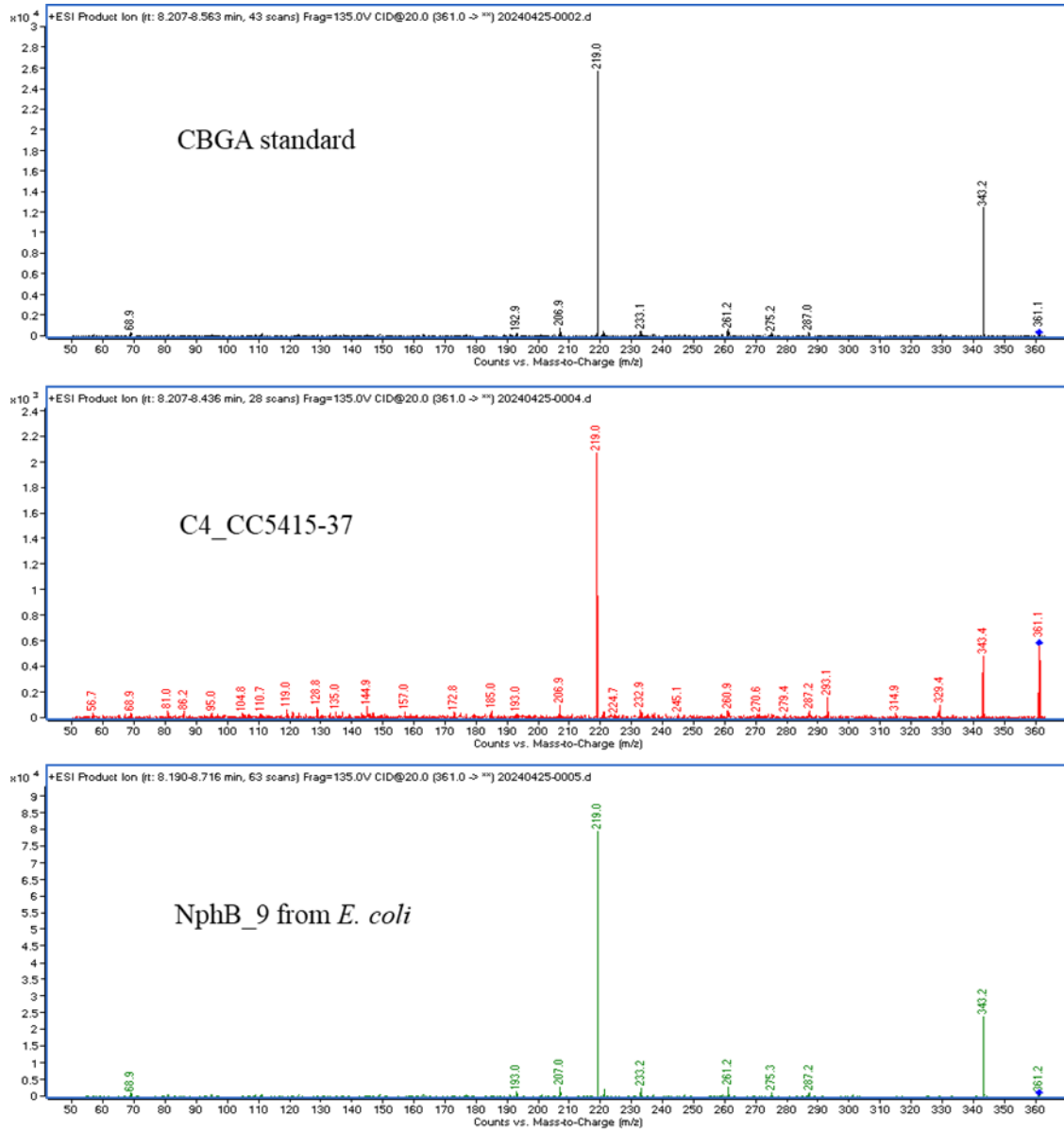


Figure S. 10. Confirmation of CBGA mass-to-charge (m/z).

The WB⁺ transformants of *C. reinhardtii* accumulated a functionally active NphB protein, producing CBGA in vitro compared to the NphB positive control from *E. coli* and to the CBGA commercial standard.

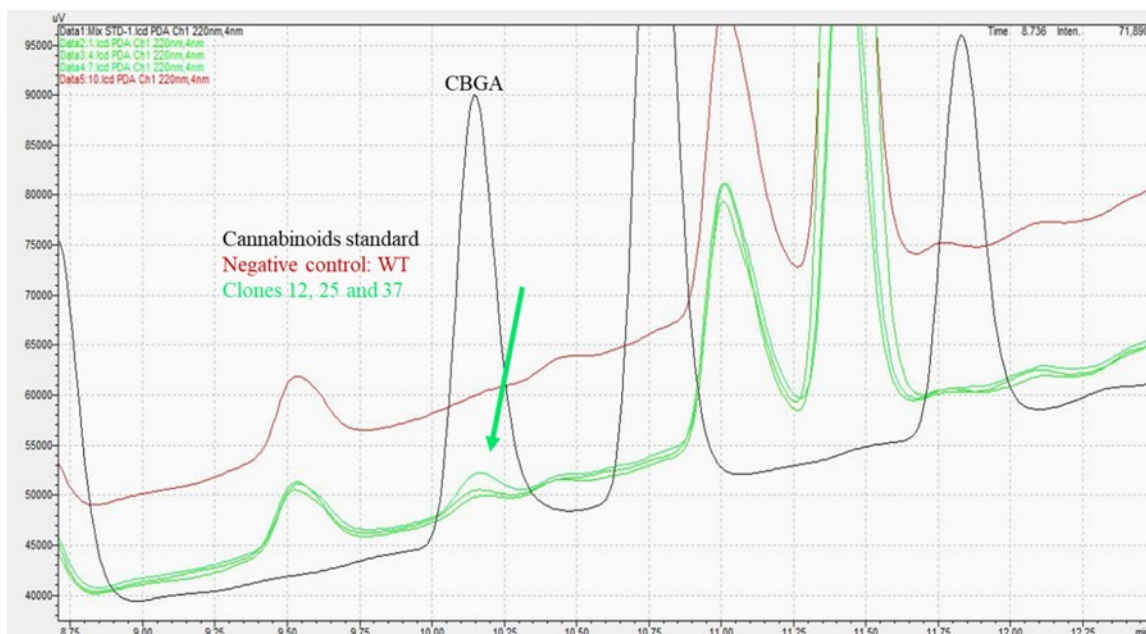


Figure S. 11. HPLC-DAD detection of CBGA in *C. reinhardtii* samples producing NphB. Chromatogram showing the CBGA peak at 10.146 min (in green highlighted with the arrow) matching the commercial standard CBGA peak (in black) after analysis of *in vitro* enzymatic products obtained from the reaction performed with the total proteins from the *C.reinhardtii* transformants producing NphB protein, compared to the wild-type (WT) in red.

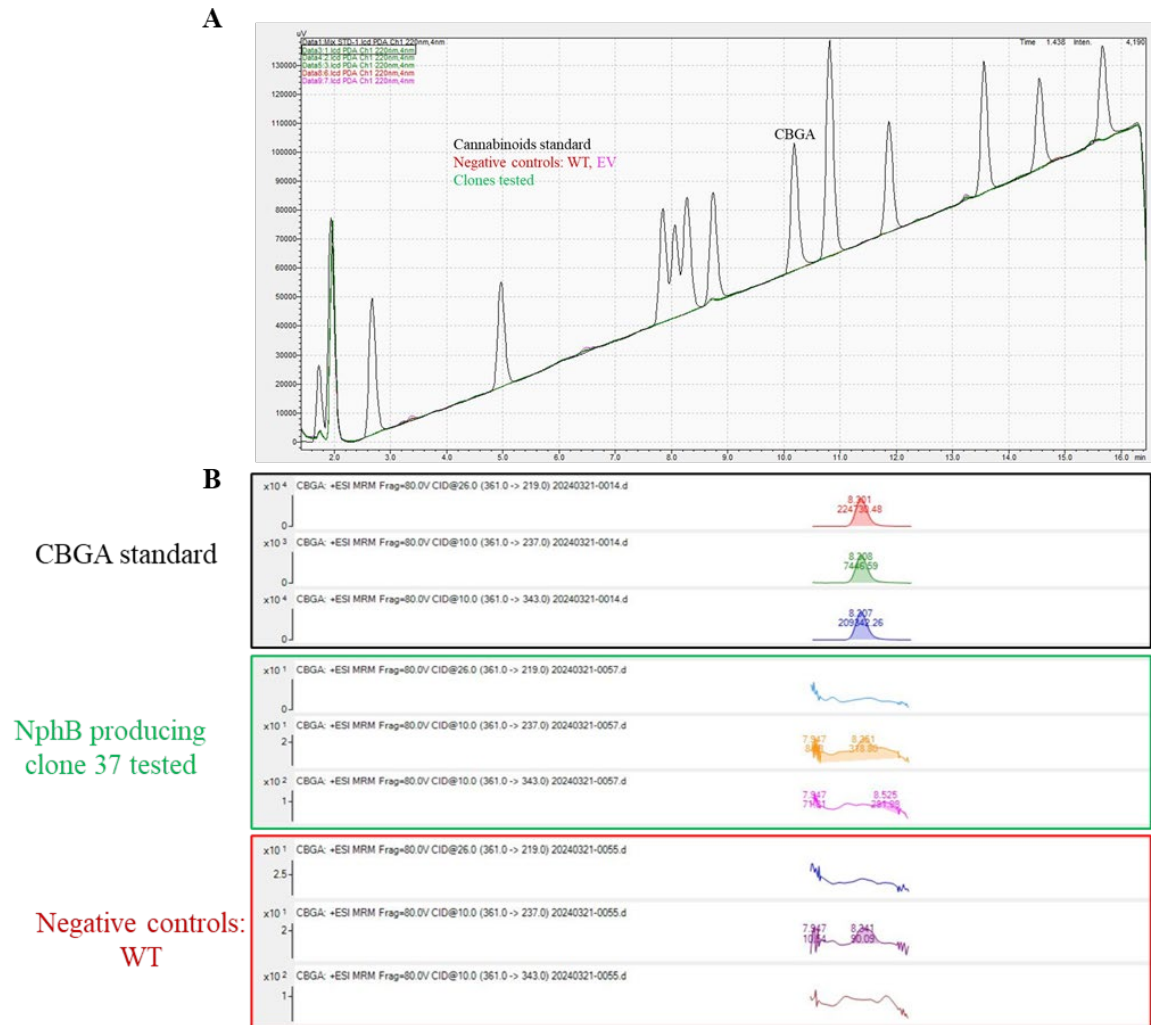


Figure S. 12. HPLC-DAD and HPLC-MS/MS chromatograms after metabolite analysis. **A)** showing no detection of CBGA in clones tested (in green), compared to the commercial standard CBGA peak (in black) at the retention time of 10.146 min after HPLC-DAD analysis of metabolites extracted from the *C. reinhardtii* clones 12, 25, and 37, selected from the strains CC-1690, CC-125, and CC-5415, respectively; **B)** the analysis by HPLC-MS/MS further confirmed no detection of CBGA in the clones tested (e.g. of clone 37). HPLC-DAD chromatograms of clones tested showed a similar profile as the negative controls, wild type (WT) in red and empty vector (EV) in pink.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S. 1. List of primers used in this study for cloning, colony-PCR, and RT-qPCR.

Genes/ constructs	Primer name	Sequence 5'→ 3'
Cloning into pOPt_mRuby2 (C1, C2, and C3)		
NphB-2A- CBDAS	Ruby2_Hyg_HpaI_C5p1_F	agcgggatccttcgaacgtacgggtGCTGAGGCTTGACATGATTGGTG
	C22_ScaI_C5p1_R	tgtcgtcgtcgtcctttagtccatcACTCTGCAAATGGAAACGGCGAC
	C5p1_ScaI_C22_F	c gcgtcgccgtttccatttcagagtgATGGACTACAAGGACGACGACG
	C5p2_ScaI_C22_R	cgctccatttacacggagcggagtCTAGGCGTAGTCAGGCACGTCA
	C22_ScaI_C5p2_F	ctatgacgtgcctgactacgcctagACTCCGCTCCGTGTAAATGGAG
	Ruby2_Hyg_SnaBI_C5p2_R	gcctcagcacgcgtatttaaattacCGCTTCAAATACGCCCAGCCC

Table S1 cont.

Genes/ constructs	Primer name	Sequence 5'→ 3'
Cloning into pOpt_mRuby2 (C1, C2, and C3)		
CBDAS	F-pOpt_mRuby-CBDAS	AACCCACGCGAGAACTTCCTGAAGTGCTTCA
	R-pOpt_mRuby-CBDAS	CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCAT
NphB	NphB_pOpt_mRuby-F	TACCCCTATGACGTGCCTGACTACGCCTAGACTCC
	NphB-pOpt_mRuby-R	GTCCTCCAGGCTGTCTGAACGCCTTG
Cloning into pSL18 (C4)		
NphB	NphB-FP- <i>Nde</i> I	CGTAC <u>CATATG</u> ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGACTACAAG GACGACGACGACAAGTC
	NphB-RP- <i>Xba</i> I	GTCA <u>TCTAGA</u> CTAGTCCTCCAGGCTGTCTGAACGCCTTGAGCAGGC

Table S1 cont.

Genes / constructs	Primer name	Sequence 5'→ 3'
Cloning into pMAL-c2x and colony-PCR of <i>E. coli</i> clones		
NphB-2A-CBDAS	F_NphB_ <i>Nde</i> I	CGTAC <u>CATATG</u> ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGACTACAAG GACGACGACGACAAGTC
	R_CBDAS-HA_ <i>Eco</i> RI	GCAT <u>GAATTC</u> TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGCGTAG TCAGGCACGT
NphB	F-NphB/ <i>Bam</i> HI	<u>GGATCC</u> ATGTCCGAGGCCGCGG
	R-NphB/ <i>Hind</i> III	<u>AAGCTT</u> TTAGTCCTCCAGGCTGTCTGAACG
Colony PCR of <i>C. reinhardtii</i> transformants		
C1, C2, and C4	Block2_F	AAGTTCTAGAGTATTTGAAGCGGGATCCTTCGAACGTAC
	Block2_R	TACTAAGCTTTGTCAAGCCTCAGCACGCGTATTTAA
C3	F_pSADp-NphB	GCTAGGATCCcacacacctgcccgtctgcctgac
	R_pSADT-NphB	GTCATACGTAcacagtcacgtgtctccccctg

Table S1 cont.

Genes / constructs	Primer name	Sequence 5'→3'
RT-qPCR primers were synthesized and validated		
<i>PGK</i>	Cr <i>PGK</i> exon9-qP F1	ATGGGTGTGTTTCGAGTTTCC
	Cr <i>PGK</i> exon9-qP R1	GTCACCGCCACCAATGAT
<i>Histone 3</i>	Cr_ <i>hist3</i> qPCR FWD Set 2	GATTGCCCAGGACTTCAAGA
	Cr_ <i>hist3</i> qPCR REV Set 2	CAGGTTGGTATCCTCGAACAG
NphB	Cr_NphB-RT-pcrFor1	CTGAGCACCTTCCAGGACAC
	Cr_NphB-RT-pcrRev1	GAACAGGCCCTTCTCCACC
CBDAS	Cr_CBDAS_RT-pcrFor	TGACGCCCTACGTGAGCAAG
	Cr_CBDAS_RT-pcrRev	CCACCAGAGTCTTCACCTTAAC

Table S. 2. Gene sequences used in this study.

CDS = coding sequence

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
NphB_{G286S/Y288A}	CDS	ATGTCCGAGGCCGCGGACGTGGAGCGCGTGTACGCGGCCATGGAGGAG GCCGCCGGCCTGCTGGGCGTGGCCTGCGCCCGCGACAAGATCTACCCG CTGCTGAGCACCTTCCAGGACACCCTGGTGGGAAGGCGGCAGCGTGGTG GTGTTTCAGCATGGCCAGCGGCCGCCACAGCACCGAGCTGGACTTCAGC ATCAGCGTGCCACCTCCCACGGCGACCCCTACGCCACGGTGGTGGAG AAGGGCCTGTTCCCCGCGACCGGCCACCCCGTGGACGACCTGCTGGCG GACACGCAGAAGCACCTGCCGGTGAGCATGTTTCGCCATCGACGGCGAG GTGACGGGCGGCTTCAAGAAGACCTACGCGTTCTTCCCCACCGACAAC ATGCCCCGGCGTGGCCGAGCTCTCGGCGATCCCCTCGATGCCCCCGCCG TGGCCGAGAACGCGGAGCTGTTTCGCGCGGTACGGCCTGGACAAGGTGC AGATGACGTCCATGGACTACAAGAAGCGCCAGGTGAACCTGTACTTCT CCGAGCTGTCGGCGCAGACCCTGGAGGCCGAGAGCGTGCTGGCCCTGG TCGGGGAGCTGGGCCTGCACGTGCCCAACGAGCTGGGCCTGAAGTTCT GCAAGCGCTCCTTCTCCGTGTACCCACCCCTGAACTGGGAGACCGGCA AGATTGACCGCCTGTGCTTCGCCGTGATTAGCAACGACCCACCCCTGGT GCCCTCCAGCGACGAGGGCGACATCGAGAAGTTCCACAACCTACGCCAC CAAGGCGCCGTACGCCTACGTGGGCGAGAAGCGCACCCCTGGTGTACGG CTTACCCTGAGCCCCAAGGAGGAGTATTACAAGCTGTCGGCCGCCTA TCACATCACCGACGTCCAGCGCGGCCTGCTCAAGGCGTTCGACAGCCT GGAGGACTAG	(Valliere et al., 2019)
ExtFMDV2A	CDS	CTGCTGGCCATCCACCCACCGAGGCCCGGCACAAGCAGAAGATCGTG GCCCCCGTCAAGCAGACGCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGC GACGTGGAGTCGAACCCCGGCCCC	(Plucinak et al., 2015)

Table S2 cont.

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
CBDAS	CDS	ATGAACCCACGCGAGAACTTCCTGAAGTGCTTCAGCCAGTACATCCCGAACAACGCCA CCAACCTGAAGCTGGTCTATACCCAGAACAACCCCCTGTACATGTCCGTCCTGAACAG CACCATCCACAACCTGCGCTTCACCAGCGACACGACCCCGAAGCCCCTCGTGATCGTG ACCCCCAGCCACGTGTCCACATCCAGGGCACCATCCTGTGCTCGAAGAAGGTGGGCC TGCAGATCCGCACCCGCAGCGGCGGCCACGACTCTGAGGGCATGTTCGTACATCAGCCA GGTGCCGTTTCGTGATCGTCGACCTGCGCAACATGCGCTCCATCAAGATCGACGTGCAC TCGCAGACCGCCTGGGTGGAGGCGGGGGCCACCCTCGGCGAGGTCTACTACTGGGTGA ACGAGAAGAACGAGAACCTGAGCCTGGCCGCCGGCTACTGCCCCGACGGTCTGCGCGG GCGGCCACTTCGGCGGGCGGCGGCTACGGCCCCCTGATGCGCAACTACGGCCTGGCGGC CGACAACATCATCGACGCGCACCTCGTGAACGTGCACGGCAAGGTGCTGGACCGCAAG TCGATGGGGGAGGACCTGTTCTGGGCCCTGCGCGGCGGCGGCCGAGAGCTTCGGCA TCATCGTCGCCTGGAAGATCCGCCTGGTGGCGGTGCCCAAGTCCACCATGTTTCAGCGT GAAGAAGATCATGGAGATCCACGAGCTCGTGAAGCTGGTCAACAAGTGGCAGAACAT CGCGTACAAGTACGACAAGGACCTGCTGCTGATGACCCACTTCATCACGCGCAACATC ACGGACAACCAGGGCAAGAACAAGACCGCCATCCACACCTACTTCAGCAGCGTGTTC TGGGCGGCGTGGACAGCCTGGTCGACCTGATGAACAAGAGCTTCCCCGAGCTGGGCAT CAAGAAGACCGACTGCCGCCAGCTGTCGTGGATCGACACCATCATCTTCTACTCCGGC GTCGTGAACTACGACACCGACAACCTTCAACAAGGAGATCCTGCTGGACCGCTCCGCGG GCCAGAACGGCGCGTTCAAGATCAAGCTGGACTACGTGAAGAAGCCCATCCCGGAGA GCGTGTTTCGTGCAGATCCTGGAGAAGCTGTACGAGGAGGACATTGGCGCCGGCATGTA CGCGCTGTACCCCTACGGCGGCATCATGGACGAGATCTCCGAGTCCGCCATCCCGTTCC CCCACCGGGCGGGCATCCTGTACGAGCTGTGGTACATCTGCAGCTGGGAGAAGCAGGA GGACAACGAGAAGCACCTGAACTGGATCCGCAACATCTACAACTTCATGACGCCCTAC GTGAGCAAGAACCCCCGCCTGGCCTACCTGAACTACCGCGACCTGGACATCGGCATCA ACGACCCCAAGAACCCGAACAACCTACACGCAGGCCCGCATTTGGGGCGAGAAGTATTT CGGCAAGAAGTTCGACCGATTGGTTAAGGTGAAGACTCTGGTGGATCCTAATAACTTC TTCCGTAATGAGCAGTCCATCCCCCCCCCTGCCGCGGCACCGCCACTAG	(Luo et al., 2019)

Table S2 cont

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
Hsp70A- RBCS2/ 5'UTR	Promoter	GCTGAGGCTTGACATGATTGGTGCGTATGTTTGTATGAAGCTACAG GACTGATTTGGCGGGCTATGAGGGCGGGGGAAGCTCTGGAAGGGC CGCGATGGGGCGCGCGGCGTCCAGAAGGCGCCATACGGCCCGCTG GCGGCACCCATCCGGTATAAAAGCCCGCGACCCCGAACGGTGACC TCCACTTTCAGCGACAAACGAGCACTTATACATACGCGACTATTCT GCCGCTATACATAACCACTCAGCTAGCTTAAGATCCCATCACCGGT GCATGCCGGGCGCGCCAGAAGGAGCGCAGCCAAACCAGGATGATG TTTGATGGGGTATTTGAGCACTTGCAACCCTTATCCGGAAGCCCC TGGCCACAAAGGCTAGGCGCCAATGCAAGCAGTTCGCATGCAGC CCCTGGAGCGGTGCCCTCCTGATAAACCGGCCAGGGGGCCTATGTT CTTTACTTTTTTACAAGAGAAGTCACTCAACATCTTAAAATG	(Lauersen et al., 2015; Schroda et al., 2000)
RBCS2/ 3'UTR	Terminator	ACTCCGCTCCGTGTAAATGGAGGCGCTCGTTGATCTGAGCCTTGCC CCCTGACGAACGGCGGTGGATGGAAGATACTGCTCTCAAGTGCTG AAGCGGTAGCTTAGCTCCCCGTTTCGTGCTGATCAGTCTTTTTCAAC ACGTAAAAAGCGGAGGAGTTTTGCAATTTTGTTGGTTGTAACGATC CTCCGTTGATTTTGGCCTCTTTCTCCATGGGCGGGCTGGGCGTATTT GAAGCG	

Table S2 cont

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
PSADp	Promoter	CACACACCTGCCCCGTCTGCCTGACAGGAAGTGAACGCATGTCGAGGGAGGCC TCACCAATCGTCACACGAGCCCTCGTCAGAAACACGTCTCCGCCACGCTCTCC CTCTCACGGCCGACCCCGCAGCCCTTTTGCCCTTTCCTAGGCCACCGACAGGA CCCAGGCGCTCTCAGCATGCCTCAACAACCCGTACTCGTGCCAGCGGTGCCCT TGTGCTGGTGATCGCTTGGAAGCGCATGCGAAGACGAAGGGGCGGAGCAGG CGGCCTGGCTGTTCGAAGGGCTCGCCGCCAGTTCGGGTGCCTTTCTCCACGCG CGCCTCCACACCTACCGATGCGTGAAGGCAGGCAAATGCTCATGTTTGCCCG AACTCGGAGTCCTTAAAAAGCCGCTTCTTGTCGTCGTTCCGAGACATGTTAGC AGATCGCAGTGCCACCTTTCCTGACGCGCTCGGCCCCATATTCGGACGCAATT GTCATTTGTAGCACAATTGGAGCAAATCTGGCGAGGCAGTAGGCTTTTAAGTT GCAAGGCGAGAGAGCAAAGTGGGACGCGGCGTGATTATTGGTATTTACGCGA CGGCCCCGGCGCGTTAGCGGCCCTTCCCCCAGGCCAGGGACGATTATGTATCA ATATTGTTGCGTTCGGGCACTCGTGCGAGGGCTCCTGCGGGCTGGGGAGGGG GATCTGGGAATTGGAGGTACGACCGAGATGGCTTGCTCGGGGGGAGGTTTCC TCGCCGAGCAAGCCAGGGTTAGGTGTTGCGCTCTTGACTCGTTGTGCATTCTA GGACCCCACTGCTACTCACAACAAGC	(Fischer et Rochaix, 2001)

Table S2 cont.

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
PSADt	Terminator	TGGCAGCAGCTGGACCGCCTGTACCATGGAGAAGAGC TTTACTTGCCGGGATGGCCGATTTCGCTGATTGATACG GGATCGGAGCTCGGAGGCTTTCGCGCTAGGGGCTAGG CGAAGGGCAGTGGTGACCAGGGTCGGTGTGGGGTCG GCCCACGGTCAATTAGCCACAGGAGGATCAGGGGGA GGTAGGCACGTCGACTTGGTTTGCGACCCCGCAGTTTT GGCGGACGTGCTGTTGTAGATGTTAGCGTGTGCGTGA GCCAGTGGCCAACGTGCCACACCCATTGAGAAGACCA ACCAACTTACTGGCAATATCTGCCAATGCCATACTGC ATGTAATGGCCAGGCCATGTGAGAGTTTGCCGTGCCT GCGCGCGCCCCGGGGGCGCAGTTTAGCTGACCAGCCG TGGGATGATGCACGCATTTGCAAGGACAGGGTAATCA CAGCAGCAACATGGTGGGCTTAGGACAGCTGTGGGTC AGTGGACGGACGGCAGGGGAGGGACGGCGCAGCTCG GGAGACAGGGGGAGACAGCGTGA CTGTG	(Fischer et Rochaix, 2001)

Table S2 cont.

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
<i>aphVII</i>	Hygromycin resistance	ATGACACAAGAATCCCTGTTACTTCTCGACCGTATTGATTCTGGATGATTCTCTACGCGAGC CTGCGGAACGACCAGGAGTTCTGGGAGCCGCTGGCCCGCCGAGCCCTGGAGGAGCTCGG GCTGCCGGTGCCGCCGGTGCTGCGGGTGCCCGGCGAGAGCACCAACCCCGTACTGGTCG GCGAGCCCGGCCCGGTGATCAAGCTGTTCGGCGAGCACTGGTGCGGTCCGGAGAGCCTC GCGTCGGAGTCGGAGGCCTACGCGGTCCTGGCGGACGCCCCGGTGCCGGTGCCCCGCCT CCTCGGCCGCGGCGAGCTGCGGGCCCGGCACCGGAGCCTGGCCGTGGCCCTACCTGGTGA TGAGCCGGATGACCGGCACCACCTGGCGGTCCGCGATGGACGGCACGACCGACCGGAA CGCGCTGCTCGCCCTGGCCCGCGAACTCGGCCGGGTGCTCGGCCGGCTGCACAGGGTGC CGCTGACCGGGAACACCGTGCTACCCCCCATTCGAGGTCTTCCCGGAACTGCTGCGG GAACGCCGCGCGGGCGACCGTCGAGGACCACCGCGGGTGGGGCTACCTCTCGCCCCGGCT GCTGGACCGCCTGGAGGACTGGCTGCCGGACGTGGACACGCTGCTGGCCGGCCGCGAAC CCCGGTTTCGTCCACGGCGACCTGCACGGGACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACC GAGGTCACCGGGATCGTCGACTTCACCGACGTGTATGCGGGAGACTCCCGCTACAGCCT GGTGCAACTGCATCTCAACGCCTTCCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCCGCGCTGCTCG ACGGGGCGCAGTGGAAGCGGACCGAGGACTTCGCCCCGCGAACTGCTCGCCTTCACCTTC CTGCACGACTTCGAGGTGTTTCGAGGAGACCCCGCTGGATCTCTCCGGCTTCACCGATCCG GAGGAACTGGCGCAGTTCCTCTGGGGGGCCGCGGACACCGCCCCCGGCGCCTGA	(Lauersen et al., 2015)

Table S2 cont.

Genes	Type	Gene sequence optimized	References
<i>aphVIII</i>	Paromomycin resistance	TCAGAAGAAGTTCGTCCAACAGCCGGTAAAACGCCAGCTTTTCCTCCGATAC CGCCCCATCCCACCCGCGCCCGTACTCCCGCAGGAACGCCGCGGAACACTC CGGCCCCGAACCACGGGTCTCCTCGTGGGCCAGCTCGCGCAGCACCAGCGC GAGATCGGAGTGCCGGTCCGCACGGCCGACCCGCCCCACGTCGATCAGCCC GGTCACCTCGCAGGTACGAGGGTTCGAGCAGCACGTTGTCCGGGCACAGGT GACCGTGGCAAACCGCCAGATCCTCGTCCGCAGGCCGAGTCCGCTCCAGCT CGGCGAGAAGCCGCTCCCCCGACCACCCCTTCCGCTCCTCGTCCAGATCCT CCAAGTCGACGCTCCCTTCAGCGACAGCACGGGCGCCTGCGGCACCGTCA CCGCGAGACTGCGATCGAACGGACACCGCTCCCAGTCCAGCGCGTGCAGC GAACGAGCGAGCCCCGCGAGCGCCACCGCCACGTCCAGCCGCTGCTCCCGC GGCCACCGCGCACTGGCCGGACGCCCCGGAACCGCTTCGGTGACCAACCA GGCGACCTCTCGTCCCCACCACCTCCACAACACGAGGTACGGGAATCCC CACCTCCGCCAACCACACCAGCCGCTCAGCCTCACCCAACAAGCCCACCCC GGCCCCCAGAGCTGCCACCTTGACAAACAACCTCCCGCCCACCACCCCGAAG CCGATAAACACCAGCCCCCGAGGCCCATCCTCCACAACAACCCACTCACA ACCGGGATACCGACCCCGCAGTGCACGCAACGCATCGTCCAT	(Fischer et Rochaix, 2001)

Table S. 3. Analytical parameters used for compound identification using high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD).

References: olivetolic acid (OA), olivetol (OL), delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabinolic acid (CBNA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG), tetrahydrocannabivarin (THCV), cannabidivarin (CBDV), retention time (RT), maximum absorption wavelengths (λ_{max}).

Compound	RT (min)	λ_{max} (nm)
OA	1.936	214/261/300
OL	1.716	202/276
THC	11.827	199/279/328
CBD	7.811	199/276
CBN	10.773	198/221/283
THCA	15.636	199/223/270/306
CBDA	8.709	198/223/269/307
CBNA	14.547	199/222/261/328
CBGA	10.146	198/222/268/305
CBC	13.517	199/226/280
CBG	8.025	199/274
THCV	8.239	199/278
CBDV	4.942	200/275

Table S. 4. Optimized instrumental parameters used for HPLC-MS/MS analyses in ESI+.

References: olivetolic acid (OA), olivetol (OL), delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabinolic acid (CBNA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG), tetrahydrocannabivarin (THCV), cannabidivarin (CBDV), retention time (RT), collision energy (CE). Quantification MRM transitions are bold, while qualifier MRM transitions are not.

Compound	RT (min)	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)	Polarity
OA	4.272	225	207	75	10	+
			123	75	18	+
			189	75	18	+
OL	4.083	181	111	75	10	+
			71	75	10	+
			93	75	26	+
THC	9.225	315	193	80	22	+
			123	80	34	+
			135	80	18	+
CBD	7.752	315	193	75	22	+
			123	75	34	+
			135	75	18	+

Table S4 cont.

Compound	RT (min)	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)	Polarity
CBN	8.825	311	223	75	22	+
			293	75	14	+
			241	75	18	+
THCA	10.334	359	341	80	14	+
			219	80	34	+
			285	80	26	+
CBDA	7.935	359	341	80	10	+
			219	80	30	+
			261	80	26	+
CBNA	9.933	355	337	85	14	+
			253	85	30	+
			235	85	30	+

Table S4 cont.

Compound	RT (min)	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)	Polarity
CBGA	8.289	361	219	80	26	+
			343	80	10	+
			237	80	10	+
CBC	9.556	315	193	75	18	+
			259	75	10	+
			81	75	10	+
CBG	7.655	317	193	80	14	+
			123	80	34	+
			207	80	10	+
THCV	8.162	287	165	75	22	+
			123	75	34	+
			231	75	18	+
CBDV	6.642	287	165	75	22	+
			123	75	34	+
			231	75	14	+

Table S. 5. CBGA peak areas obtained with the *C. reinhardtii* WB⁺ transformants.

Clones from the strains CC-5415, CC-125, and CC-1690 tested for the in vitro enzymatic assay showed CBGA production after analysis by HPLC-MS/MS.

<i>C. reinhardtii</i> strains	WB+ clones tested	CBGA peak area
CC-5415	4	9717.74851
	5	32943.8604
	6	30127.02
	8	8368.85007
	10	16762.1016
	37	34711.9617
	WT	Not detected
	C+ (NphB expressed in Bacteria)	2904845.28
CC-125	25	36709,52926
	29	19858.80924
	64	13792.38187
	66	11045.42278
	85	18800.53448
	95	12722.9058
	97	10217.03439

Table S5 cont.

<i>C. reinhardtii</i> strains	WB+ clones tested	CBGA peak area
CC-125	98	Not detected
	101	10856.97318
	117	6758.663872
	142	16607.58164
	148	12622.62841
	181	Not detected
	182	4904.456476
	187	6132.950473
	WT	Not detected
	C+ (NphB expressed in Bacteria)	3069991.921
CC-1690	8	30168.62603
	9	8615.292705
	12	83915.14025
	15	46165.52638
	27	81865.52452
	30	56723.32368
	46	44445.57859

Table S5 cont.

<i>C. reinhardtii</i> strains	WB+ clones tested	CBGA peak area
CC-1690	47	5589.331025
	48	7271.732942
	49	4206.08167
	56	21056.19999
	60	13204.18278
	61	5732.458053
	63	10129.23354
	65	2786.874686
	66	30170.85247
	72	7182.685974
	78	27178.03189
	80	8872.063057
	81	Not detected
	WT	Not detected
	C+ (NphB expressed in Bacteria)	3069991.921