

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes
Spécialité : Génie des procédés et bioprocédés

Par **Marie ESNARD**

Ingénierie génétique de *Chlamydomonas reinhardtii* pour une approche vers l'expression de protéines et l'assemblage de vecteurs viraux AAV.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 octobre 2025

Unités de recherche: UMR_S1089 Translational Research in Gene Therapy (TaRGeT) et UMR_C 6144
Laboratoire de Génie des Procédés - Environnement - Agroalimentaire

Rapporteurs avant soutenance :

Elodie Mathieu-Rivet Maître de conférences à l'Université de Rouen
Giuseppe Ronzitti Directeur de recherche à l'UMR_S951 (INSERM)

Composition du Jury :

<u>Président :</u>	<u>Prénom Nom</u>	<u>Fonction et établissement d'exercice (8)(à préciser post soutenance)</u>
<u>Examinateurs :</u>	Jean-François Sassi	Senior Fellow expert au CEA de Cadarache
	Eric Olmos	Professeur des universités (Université de Lorraine)
<u>Directeur de thèse :</u>	Luc Marchal	Professeur des Universités (Polytech Nantes)
<u>Co-directrice de thèse :</u>	Oumeya Adjali	Directrice de recherche à l'URM1089 (INSERM)
<u>Encadrante :</u>	Marie Renaudie	Maître de conférences (Polytech Nantes)

Ingénierie génétique de *Chlamydomonas reinhardtii* pour une approche vers l'expression de protéines et l'assemblage de vecteurs viraux AAV.

Mots clés : Microalgues, bioingénierie, génie génétique, bioproduction, thérapie génique, AAV.

Abstract : La microalgue *C. reinhardtii* est un organisme modèle en raison de son génome qui a été caractérisé et dont les outils génétiques ont été développés. La production de protéines recombinantes dans les microalgues est un domaine émergent, encore peu mature par rapport aux systèmes d'expression classiquement utilisés comme les cellules animales ou bactériennes. En particulier, la littérature reste floue quant aux modifications génétiques réellement indispensables à réaliser dans le gène d'intérêt afin d'obtenir une expression optimale et stable de la protéine souhaitée. Ainsi la première partie de ce travail de thèse a permis de déterminer la combinaison génétique la plus favorable pour l'expression d'une protéine recombinante modèle, mCherry. Les séquences optimisées ont permis de produire cette protéine à un taux maximum de 19 mg/L, un rendement qui est à ce jour le plus élevé décrit dans la littérature.

Les microalgues ainsi modifiées génétiquement ont été maintenues en culture liquide ce qui révèle une possible montée en échelle. D'autre part, à l'heure actuelle, il y a peu de données quant à la faisabilité de l'expression dans les microalgues de protéines complexes et de grandes tailles telles que celles dérivées des virus adéno-associées (AAV) dans le but de produire des vecteurs recombinants pour la thérapie génique. En effet, la bioproduction d'AAV dans les microalgues permettrait de répondre en partie aux enjeux actuels de bioproduction d'AAV. La deuxième partie de ce travail de thèse a ainsi eu un caractère exploratoire et innovant. L'objectif de produire, dans *C. reinhardtii* les protéines virales principales de l'AAV2 Rep et Cap dont l'assemblage est complexe. L'ensemble des travaux de cette thèse ont permis d'accumuler de nouvelles connaissances quant au génie génétique des microalgues à des fins de production de biothérapies en santé humaine.

Genetic engineering of *Chlamydomonas reinhardtii* for protein expression and AAV viral vector assembly.

Keywords: Microalgae, bioengineering, genetic engineering, bioproduction, gene therapy, AAV.

Abstract: The microalgae *C. reinhardtii* is a model organism because its genome has been characterised and genetic tools developed. The production of recombinant proteins in microalgae is an emerging field, which is not yet as mature as the expression systems classically used, such as animal or bacterial cells. In particular, the literature remains unclear as to the genetic modifications that are actually required in the gene of interest in order to obtain optimal and stable expression of the desired protein. In the first part of this thesis, we determined the most favourable genetic combination for the expression of the recombinant mCherry protein model. This enabled the protein to be produced at a maximum level of 19 mg/L, the highest yield in the literature to date. The genetically modified microalgae were kept in liquid culture, which

proved to be scalable. On the other hand, there are currently no publications reporting the expression of AAV-derived proteins in microalgae with the aim to produce recombinant AAV gene therapy viral vectors. Evaluating the feasibility of AAV production in microalgae would provide a partial answer to the current challenges of AAV manufacturing. The second part of this thesis work is therefore exploratory and innovative with the aim. To produce in *C. reinhardtii* AAV2 main, viral proteins of large size and complex assembly, Rep and Cap. The work carried out in this thesis has led to the accumulation of new knowledge on the genetic engineering of microalgae for bioproduction of biotherapeutic products for human healthcare.