
Les microalgues : usines cellulaires productrices de molécules commerciales recombinantes

Jean-Paul CADORET^{1,*}, Muriel BARDOR², Patrice LEROUGE², Morgan CABIGLIERA³,
Vitalia HENRIQUEZ⁴, Aude CARLIER¹

1 Laboratoire PBA, IFREMER, Centre de Nantes, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44 311 Nantes Cedex 03

2 Université de Rouen, CNRS UMR 6037, IFRMP 23, Faculté des Sciences, 76 821 Mont-Saint-Aignan Cedex

3 Algenics, 5 rue d'Auvours 44 000 Nantes

4 Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso PO Box 4059, Valparaíso Chile

*: Corresponding author : Cadoret J. P., email address : jean.paul.cadoret@ifremer.fr

Introduction

L'extraction de substances naturelles constitue la source principale d'approvisionnement pour nombre de molécules pharmaceutiques. Dans la mesure où il est possible d'identifier les gènes codant pour une molécule, ceux-ci peuvent être introduits dans des cellules en culture qui deviennent alors autant d'usines cellulaires fabriquant le produit souhaité. Dans la dynamique créée par l'arrivée de nouveaux systèmes d'expression végétaux, les microalgues, organismes unicellulaires aquatiques, apportent des compléments stratégiques et devraient constituer à l'avenir un système performant de production de molécules recombinantes commerciales.

Les différents systèmes d'expression

A ce jour, plusieurs systèmes d'expression de protéines recombinantes ont été développés, offrant chacun des avantages et des inconvénients. Pour les molécules simples, les bactéries suffisent ; c'est le cas, par exemple, de l'hormone de croissance, de l'insuline, des interférons alpha et bêta, de l'interleukine et du TNF (tumor necrosis factor) [1]. Cependant, ces organismes ne peuvent assembler et maturer des molécules complexes : pas de modifications post-traductionnelles comme les glycosylations, d'isomérisation cis/trans des prolines, de lipidation ou de phosphorylation. La présence de corps d'inclusion qui rendent difficile la purification ou la production d'endotoxines complètent cette liste de défauts. En conséquence, la production de protéines recombinantes complexes requiert l'usage de systèmes d'expression eucaryote [2]. Parmi les modifications post-traductionnelles, la N-glycosylation revêt une importance particulière car elle a un impact majeur sur la conformation et par conséquent sur l'activité des protéines thérapeutiques produites par transgénèse. Ce processus débute par le transfert d'un précurseur oligosaccharidique sur un résidu asparagine de la protéine néo-synthétisée, suivi d'une maturation dans le réticulum endoplasmique puis d'une étape de modification des N-glycannes par transfert de nouveaux résidus dans l'appareil de Golgi. Ces modifications golgiennes diffèrent entre cellules eucaryotes et il en résulte des différences structurales entre N-glycannes associées aux protéines matures. En conséquence, si tout système eucaryote est apte à introduire des N-glycannes indispensables à la mise en conformation des protéines, les différences de maturations de ceux-ci peuvent limiter ou interdire l'emploi en thérapie des molécules recombinantes, notamment par déclenchement de réponses immunitaires. Ainsi, les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* et *Hansenula*

polymorpha, [1]) introduisent sur leurs glycoprotéines des polymannoses de grande taille [3]. Le système d'expression en cellules d'insectes, *via* un Baculovirus, constitue un procédé attrayant de production de protéines par transgénèse. Les cultures croissent en suspension et la plupart des protéines surexprimées dans les cellules d'insectes restent solubles [1]. Cependant, la sialylation des glycoprotéines, étape ultime de la glycosylation, aboutit rarement. De même, la production dans des cellules animales (CHO, BHK et MML¹) [1], malgré leur origine animale, rencontre également des problèmes de sialylation terminale des N-glycannes [4]. Quel que soit le système considéré, plusieurs stratégies ont été développées pour corriger les différences observées de glycosylation entre protéines naturelles et recombinantes, soit par l'inactivation de gènes codant pour des enzymes introduisant les résidus immunogènes, soit par complémentation par des gènes codant des enzymes permettant de reconstruire les séquences glucidiques absentes dans ces organismes [5]. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus par Gerngross et collaborateurs, au sein de la société GlycoFi (USA), qui ont complètement "humanisée" la N-glycosylation chez la levure par la suppression de 4 gènes et l'ajout de 14 autres [6].

Les cellules végétales peuvent, quant à elle, procéder à un repliement et à l'assemblage de protéines recombinantes complexes, ainsi qu'au transfert et à la maturation de N-glycannes sur celles-ci. De plus, les organismes photosynthétiques offrent deux voies biologiques très différentes dans l'expression et la production de molécules recombinantes : une voie nucléaire et une voie chloroplastique (Tableau 1). Les travaux pionniers de Hiatt avec la production d'anticorps fonctionnels exprimés dans du tabac transgénique ont consacré le terme de "Plantibodies" [7]. De nombreuses autres molécules recombinantes actives, vaccins, anticorps monoclonaux, enzymes et hormones, ont été depuis produites avec succès [8]. Plusieurs plantes sont concernées, le tabac, le riz, le blé, la luzerne, le pois par exemple. Mais les cellules de plantes introduisent des épitopes glucidiques β 1,2-xylose et α 1,3-fucose immunogènes chez l'humain [9] nécessitant des interventions génétiques [10]. Les premières commercialisations de molécules issues de plantes génétiquement modifiées ont concerné l'avidine, produite dans le maïs en 1997, la β -glucuronidase en 1998 ou plus récemment, la trypsine. Le risque de dissémination de gènes dans le milieu naturel reste le principal écueil à l'essor de la production de molécules recombinantes chez les végétaux supérieurs, bien que les stratégies de transformation des chloroplastes tentent de répondre à cette question. A la grande variation des niveaux d'expression d'une plante à une autre, s'ajoute l'instabilité de l'expression dans les feuilles ce qui nécessite une extraction et une purification rapide avant d'éventuelles dégradations. De plus, la réaction du public vis à vis des plantes génétiquement modifiées demeure imprévisible. Pour pallier à cet obstacle on fait produire ces molécules d recombinantes par des cellules végétales en bioréacteurs confinés et sûrs. La détection des transgènes est rapide et l'expression des molécules recombinantes peut se faire dans le milieu de culture. Néanmoins, les rendements restent faibles et les effets mécaniques fragilisants.

Autre exemple de végétal, la mousse (*Physcomyrella patens*) transgénique. Des lignées transformées stables sont obtenues en 8 semaines et le biais de codon² serait plus proche de l'animal que des plantes dressées. Le point de l'immunogénicité de leur N-glycosylation a été contourné par l'extinction des gènes codant pour les enzymes responsables de l'ajout des épitopes glucidiques immunogènes (β 1,2-xylose et α 1,3-fucose). Ces travaux ont récemment aboutis à l'expression d'EPO humaine [11]. Autre exemple, la lentille d'eau *Lemna* (plante clonale utilisée par la société Bioplex) possède un temps de génération court, un rendement élevé en protéines et un système d'excrétion permettant une production de protéines à faibles coûts. L'immunogénicité des N-glycannes a également pu être abolie chez cette plante [12].

¹ CHO: Chinese Hamster Ovary, BHK: Baby Hamster Kidney, MML: Murine Myeloma Lines

² Les triplets de nucléotides offrent 64 combinaisons pour 20 acides aminés, l'utilisation et le choix de ces combinaisons est appelé biais de codon.

Les microalgues

Les microalgues vivent *de facto* en suspension. Des centaines de milliers d'espèces de microalgues sont réparties sur la surface du globe en milieu marin, dulçaquicole ou saumâtre. Elles ont colonisé les glaces polaires, les zones désertiques et les sources d'eau chaudes. Elles vivent dans des marais salants, dans des milieux acides ou fortement alcalins. Elles jouent un rôle majeur dans le climat mondial comme machine à transformer le CO₂ en matière organique. Leur culture en photobioréacteurs confinés est maîtrisée, réduisant les risques de dissémination et de pollution génique. Elles procurent d'excellents rendements en biomasse et restent compétitives en coûts de production. Elles n'exigent pour leur développement que de l'eau (douce ou salée), des éléments nutritifs, du carbone et de la lumière. Le taux de division cellulaire rapide (de l'ordre du jour) permet d'atteindre des densités cellulaires élevées et de répondre rapidement à toute stratégie de recherche et développement. L'activité d'une nouvelle construction génétique transférée peut être recherchée et mesurée un mois après sur une pré-culture et un volume conséquent (300 litres) atteint deux mois plus tard, représentant une biomasse très importante (1 à 3 grammes sec par litre).

La transformation génétique chez les microalgues a fait son apparition dans les années 80. Les espèces phares sont alors *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricorutum* et *Chorella vulgaris* (Tableau 2). Les perspectives et le potentiel des microalgues comme usines cellulaires ont été abordés et traités par différents auteurs, récemment et de façon plus ou moins exhaustive [13-17]. L'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* s'est vite imposée comme système modèle [18]. Elle peut être cultivée de façon auto et hétérotrophe en utilisant de l'acétate comme source de carbone. Des séquences promotrices nucléaires et chloroplastiques ont été identifiées. Actuellement, *C. reinhardtii* n'est plus seulement un modèle d'étude fondamentale [18] mais est au cœur d'applications biotechnologiques avec la production de biohydrogène et la biorémédiation des sols pollués par des métaux lourds. Parmi les autres microalgues utilisées dans un cadre biotechnologique, citons l'expression transitoire de l'hormone de croissance humaine dans le milieu extracellulaire de *Chlorella sp.* Des soles alimentées avec *Chlorella ellipsoidea*, exprimant une hormone de croissance de sole, atteignent une taille de 25% supérieure au poissons témoins après 10 jours de culture. Par ailleurs, des tests antimicrobiens *in vitro* ont montré la grande efficacité d'expression par les cellules de *chlorella*, du peptide neutrophile 1 (NP-1), biologiquement actif. L'expression du gène VP1 du virus de la fièvre aphteuse chez *Chlamydomonas* reste le seul exemple de production de protéine vaccinale (Tableau 3). En terme de production de protéine thérapeutique, le résultat le plus marquant est à ce jour la production de *large single chain* (lsc) d'anticorps dans la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* par l'équipe de S. Mayfield (Tableau 3).

Les processus de N-glycosylation chez les microalgues n'ont pas à ce jour été explorés. Compte tenu de leur importance dans le cadre de la production de molécules recombinantes, nous avons entrepris une étude de ces processus chez plusieurs microalgues pressenties comme potentielles usines cellulaires. "L'ancestralité" de plusieurs groupes phylogénétiques de phytoplancton laisse espérer de disposer d'organismes dont les processus de glycosylation auront gardé des caractéristiques "primitives" en amont du point de divergence entre les plantes supérieures et les animaux. On pourrait ainsi éluder l'obligatoire et difficile "adaptation" des processus de glycosylation.

La composition en nucléotide varie grandement entre genres, et dans un moindre mesure entre espèces voire dans un même génome. A titre d'exemple le génome nucléaire des diatomées montrera un pourcentage proche de l'équilibre avec, chez *Phaeodactylum tricorutum* un pourcentage total en GC de 48,5%, *Thalassiosira sp.*, un pourcentage de 49,63% alors que

des algues de la lignée verte telle *Chlorella vulgaris* comptent 63,92 % de GC, proche de *Chlamydomonas reinhardtii* avec 63%. Les algues rouges, si l'on se réfère à *Porphyridium cruentum* (59,4 %) seront proches des algues vertes là où les plantes terrestres seront en dessous de la barre moyenne puisque *Arabidopsis thaliana* présente un taux en GC de 44,60 % et le tabac 43,57. Cet équilibre revêt une importance particulière dans le cas de l'expression de protéines hétérologues d'origine humaine, puisque *Homo sapiens* privilégie un usage des nucléotides GC à 52,4%. Il faut noter la relative homogénéité de tous les plastides quelques soient les microalgues considérées avec pour *Phaeodactylum sp.* (33,69), *Thalassiosira sp.* (30,17), *Chlorella vulgaris* (34,63), *Chlamydomonas reinhardtii* (35,16), *Dunaliella sp* (32,62), *Tetraselmis sp.* (39,18), *Porphyridium cruentum* (36,51).

Les contraintes techniques

A l'exception de méthodes anecdotiques telles la transformation par billes de verre de *Chlamydomonas reinhardtii*, la transformation par des trichites de carbure de silicium (SiC) ou la transformation par *Agrobacterium* chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'électroporation (consistant à soumettre les cellules à un champ électrique pour former des pores) est une des premières méthodes mise en œuvre avec succès pour la transformation nucléaire de quatre espèces de microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris* et *Dunaliella salina*. Le bombardement par microparticules ou biolistique utilise des microparticules inertes d'or ou de tungstène recouvertes d'ADN et propulsées à grande vitesse par un gaz comprimé. C'est la méthode utilisée pour *Chlamydomonas*, *Chlorella* et *Volvox*. Elle s'est aussi montrée particulièrement efficace pour la transformation de diatomées (Tableau 2).

Dans la liste des promoteurs utilisés chez les microalgues, on trouve le très classique promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, utilisé avec succès chez *Chlorella ellipsoidea* [19]. A mentionner le promoteur de *nitrate reductase* endogène, actif chez *Chlamydomonas reinhardtii* mais aussi chez la diatomée *Cylindrotheca fusiformis*. Dans la voie nucléaire, l'évènement le plus courant est une recombinaison dite non homologue. Plusieurs techniques ont tenté de favoriser l'intégration en agrandissant la taille des vecteurs ou en incluant des marqueurs de sélection particuliers, mais dans la plupart des cas on assiste à quelques intégrations aléatoires dans le génome (intégrations ectopiques). Des travaux déterminants sur ce sujet ont été publiés et une piste pourrait consister à identifier un site silencieux à l'exemple de *Chlamydomonas reinhardtii*. La transformation chloroplastique a été décrite pour la première fois chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Les promoteurs provenant des gènes chloroplastiques tels *rbcL* (ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase sous-unité majeure) et *atpA* (subunité λ -ATP synthase) de *Chlamydomonas reinhardtii* sont les plus fréquents. Les gènes rapporteurs couramment utilisés pour les études d'expression des gènes dans le chloroplaste sont le gène *gfp* "Green Fluorescent Protein" (GFP), *luxCt* (Luciférase, LUC) et le gène *uidA* (GUS). Ces marqueurs fonctionnent sur d'autres groupes d'algues, comme par exemple la diatomée *Phaeodactylum tricorutum*. Une telle entreprise bénéficie grandement des avancées qu'offre la publication des données de séquençages complets des génomes. La liste s'étoffe et nous avons dorénavant accès aux génomes complets de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cyanidoschison merolae*, *Thalassiosira pseudonana*, *Ostreococcus taurii* et *Phaeodactylum tricorutum* en cours d'annotation et à laquelle nos équipes participent.

Conclusion

L'industrie pharmaceutique et les sociétés de biotechnologie sont confrontées à un défi majeur : celui de disposer de systèmes de production de protéines recombinantes qui puissent répondre à leurs contraintes à la fois en terme de qualité, de quantité produite et de rentabilité. Il existe au niveau mondial un déficit de capacité de production de ces protéines recombinantes, car les systèmes actuellement disponibles ne permettent pas de produire la quantité et la qualité pour un coût raisonnable. Ce besoin va s'accroître dans les années à venir. Depuis la fin des années 1990, plus de 280 protéines recombinantes thérapeutiques, dont une vingtaine d'anticorps monoclonaux, sont commercialisées, représentant un chiffre d'affaire estimé à près de 49 milliards de dollars US en 2006. Ce segment connaît une croissance de 20% par an contre 7% pour l'industrie pharmaceutique globale et près de 2200 nouvelles protéines recombinantes sont actuellement en phase clinique. L'idée de créer une structure de production de molécules recombinantes à haute valeur commerciale dans un système microalgue a déjà conduit à la création de deux sociétés aux USA. La stratégie est tangible et son succès est exclusivement dépendant de choix judicieux en terme d'espèces de microalgues, de molécules exprimées et de ressource humaine.

Remerciements

Nous tenons à remercier les deux évaluateurs anonymes pour leur aide et critiques constructives.

Microalgae as cell factories producing recombinant commercial protein.

Extraction of natural substances and chemical synthesis are the main sources of pharmaceutical molecules. When possible, one may transfer the gene of the molecule in living cells creating individual factories producing on demand and in a safe way the requested molecule. Today, bacteria, yeast, mammalian cells and plants constitute the main platforms for various commercial products. Microalgae present numerous advantages and could offer a powerful tool for the production of commercial molecules in a near future.

Mots clés

Biotechnology, gene transfer, pharmaceuticals, algae, recombinant, genetics

Biotechnologie, transfert de gène, pharmaceutique, algues, recombinant, génétique

Tableau 1 : Comparaison des deux voies d'expression: Chloroplastique et Nucléaire chez les plantes

	Génome chloroplastique	Génome nucléaire
Nombre de copies de transgène	10–100 copies de génome (chromosome circulaire simple) par chloroplaste, aboutissant à plusieurs copies de transgènes.	Le nombre de chromosomes est spécifique d'une espèce, et chacune des deux copies des chromosomes présents dans la cellule peut intégrer plusieurs copies du transgène.
Niveau d'expression du gène	La polyplœidie résulte en une abondance de transcripts transgéniques et en une grande accumulation de protéines étrangères (jusqu'à 47% de protéines solubles totales).	La régulation des gènes détermine le taux de transcription. L'accumulation de protéines étrangères peut être une limitation.
Arrangement et transcription de gènes	Les gènes peuvent être arrangés en opérons afin d'introduire et d'exprimer de multiples transgènes lors d'un seul événement de transformation.	Chaque transgène est inséré indépendamment dans le chromosome.
Effet de positionnement	Les insertions spécifiques de sites au travers de deux événements de recombinaison homologue éliminent les effets de positionnement de l'expression du transgène.	Les insertions aléatoires résultent en des niveaux d'expression transgéniques variables.
"Gene silencing"	Non documenté.	Le "gene silencing" conduit à une diminution ou élimination de l'expression des transgènes. Des problèmes de transcription et de post-transcription de gènes inhibés sont rapportés.
Confinement de gènes	Les gènes sont transmis par la voie maternelle évitant une dissémination du gène par le pollen.	Les transgènes hérités peuvent être disséminés par croisement entre les plantes cultivées et plantes sauvages.
Formation de ponts disulfures et intégration	Les chloroplastes forment des ponts disulfures et expriment correctement des protéines d'origine humaine, les rendant idéales pour le développement de vaccins comestibles, la pharmaceutique et les «planticorps».	Pour la formation de ponts disulfures, les protéines sont ciblées au niveau du réticulum endoplasmique.
Protéines toxiques et étrangères	Les effets létaux des protéines toxiques peuvent être minimisés grâce à la compartimentation du chloroplaste.	L'accumulation de protéines toxiques à l'intérieure du cytosol peut provoquer de sérieux effets pléiotropiques.
Lignes transgéniques	Expression du gène uniforme.	Expression du gène hautement variable.
Homogénéité de la ploïdie	Les lignées transgéniques chloroplastiques sont généralement homoplasique (L'ensemble des copies génomiques sont homogènes pour le transgène). L'homoplasie est généralement complétée par une sélection répétitive.	Les lignées transgéniques nucléaires sont hétérozygotes ou homozygotes.
Glycosylation	Semble absente.	Les cellules eucaryotes végétales glycosylent mais selon des schémas légèrement différents des mammifères.

Tableau 2 : Microalgues transformées et méthodes utilisées

Microalgue	Méthode de transformation	Génome	Référence
<u>Microalgues vertes</u>			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[20]
		Chloroplastique	[21]
		Mitochondrial	[22]
	Electroporation	Nucléaire	[23]
	Billes de verre	Nucléaire	[24]
	Trichites de carbure de silicium	Nucléaire	[25]
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Nucléaire	[26]
<i>Dunaliella salina</i>	Electroporation	Nucléaire	[27]
<i>Dunaliella salina</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[28]
<i>Chlorella ellipsoïda</i>	Polyéthylène glycol	Nucléaire	[29]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[30]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Electroporation	Nucléaire	[31]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Bombardement de Microparticules	Nucléaire	[32]
<i>Volvox carteri</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[33]
<u>Diatomées</u>			
<i>Cyclotella triptyca</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[34]
<i>Navicula saprophila</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[34]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[35]
<i>Cylindrotheca fusiformes</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[36]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Bombardement de microparticules	Nucléaire	[37]
<u>Dinoflagellés</u>			
<i>Amphidinium spp.</i>	Trichites de carbure de silicium	Nucléaire	[38]
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	Trichites de carbure de silicium	Nucléaire	[38]
<u>Algues rouges</u>			
<i>Cyanidoschyzon merolae</i>	Electroporation	Nucléaire	[39]
<i>Porphyridium sp.</i>	Bombardement de microparticules	Chloroplastique	[40]
<u>Euglenoids</u>			
<i>Euglena gracilis</i>	Bombardement de microparticules	Chloroplastique	[41]

Tableau 3 : Principales molécules produites chez les microalgues

Protéine thérapeutique	Microalgues	Références
IgA1 (virus de l'herpes)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[15]
HSV Isc		[42]
M-SAA		[43]
Hormone de croissance	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	[19]
Antigène		
VP1 fièvre aphteuse	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[44]

Références

1. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004; 65(4): 363-372.
2. Hunt I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr Purif*, 2005; 40(1): 1-22.
3. Sodayer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Biodrugs*, 2004; 18(1): 51-62.
4. Lee E, Roth J, Paulson JC. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta- galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem*, 1989; 264(23): 13848-13855.
5. Paccalet T, Bardor M, Rihouey C *et al.* Synthesis of Sialic Acid in Plants. *Plant Biotech J*, 2007; 5: 12-25.
6. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N *et al.* Humanization of Yeast to Produce Complex Terminally Sialylated Glycoproteins. *Science*, 2006; 313(5792): 1441-1443.
7. Hiatt A, Caffferkey R, and Bowdish C. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989; 342: 76-78.
8. Ma JKC, Chikwarnba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman, RM. Plant-derived pharmaceuticals - the road forward. *Trends Plant Sci*, 2005; 10(12): 580-585.
9. Bardor M, Faveeuw C, Fitchette AC *et al.* Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core {alpha}(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*, 2003; 13(6): 427-434.
10. Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol*, 2007; 25(7): 317-323.
11. Weise A, Altman F, Rodriguez-Franco M *et al.* High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol J*, 2007; 5(3): 389-401.
12. Frank W, Decker EL, Reski R. Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol*, 2005; 7(3): 220-227.
13. Stevens DR, Purton S. Genetic engineering of eukaryotic algae: Progress and prospects. *J Phycol*, 1997; 33(5): 713-722.
14. Leon-Banares R, Gonzalez-Ballester D, Galvan A, Fernandez E. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol*, 2004; 22: 45-52.
15. Franklin SE, Mayfield SP. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Ext Opin Biol Ther*, 2005; 5(2): 225-235.
16. Walker TL, Collet C, Purton S. Algal transgenics in the genomic ERA. *J Phycol*, 2005; 41(6): 1077-1093.
17. Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep*, 2005; 24(11): 629-641.
18. Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Phys*, 2001; 52: 363-406.

19. Kim DH, Kim YT, Cho JJ *et al.* Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Marine Biotechnol*, 2002; 4(1): 63-73.
20. Debuchy, R., Purton, S. and Rochaix, J-D., The arginosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *Embo J*, 1989; 8 n°10: 2803-2809.
21. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH *et al.* Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988; 240(4858): 1534-8.
22. Randolph-Anderson BL, Boynton JE, Gillham NW *et al.* Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet*, 1993; 236(2-3): 235-44.
23. Brown LE, Sprecher SL and Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol Cell Biol*, 1991; 11 n°4: 2328-2332.
24. Kindle K. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Aca Sci*, 1990; 87: 1228-1232.
25. Dunahay TG. Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide fibers. *J Phycol*, 1992; 28: 11.
26. Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV. Genetic transformation of the green alga - *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 2004; 166(3): 731-738.
27. Geng DG, Wang YQ, Wang P, Li WB, Sun YR. Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, 2003; 15(6): 451-456.
28. Tan C, Qin S, Zhang Q, Jiang P, Zhao F. Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *J Microbiol*, 2005; 43(4): 361-5.
29. Jarvis EE, Brown LM. Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr Genet*, 1991; 19(4): 317-321.
30. Dawson, H.N., R. Burlingame, and A.C. Cannons, Stable transformation of *Chlorella*: Rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.*, 1997; 35(6): 356-362.
31. Chow K, Tung WL. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Reports*, 1999; 18: 778-780.
32. Teng CY, Qin S, Liu JG, Yu DZ, Liang CW, Tseng CK. Transient expression of lacZ in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol*, 2002; 14(6): 497-500.
33. Scheidlmeier B, Schmitt R, Müller W *et al.* Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91: 5080-5084.
34. Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J Phycol*, 1995; 31: 1004-1012.

35. Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mol Gen Genet*, 1996; 252: 572-579.
36. Fischer H, Robl I, Sumper M, Kroger N. Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 1999; 35(1): 113-120.
37. Poulsen N, Kroger N. A new molecular tool for transgenic diatoms - Control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette. *Febs Lett*, 2005; 272(13): 3413-3423.
38. ten Lohuis MR, Miller DJ. Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll a proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* hultburt (Dinophyceae). Changes in cytosine methylation accompany photoadaptation. *Plant Physiol*, 1998; 117(1): 189-96.
39. Minoda A, Sakagami R, Yagisawa F, Kuroiwa T, Tanaka K. Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell Physiol*, 2004; 45(6): 667-71.
40. Lapidot M, Raveh D, Sivan A, Arad S, Sapira M. Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species. *Plant Physiol*, 2002; 129: 7-12.
41. Doetsch NA, Favreau MR, Kuscuoglu N, Thompson MD, Hallick RB. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic psbK operon. *Curr Genet*, 2001; 39(1): 49-60.
42. Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100(2): 438-442.
43. Manuell AL, Beligni MV, Elder JH *et al*. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J*, 2007; 5: 402-412.
44. Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Chen G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett*, 2003; 25: 1087-1092.