



Définition

La Biologie Synthétique est
la **conception (design)** et la **construction** de systèmes
biologiques nouveaux comme des enzymes, circuits
génétiques et cellules
OU
la **reconception (redesign)** de systèmes biologiques
existants.

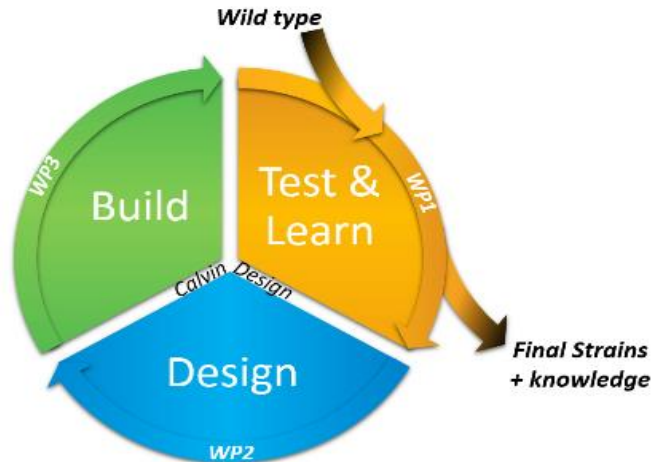
Biologie synthétique

Une discipline formelle d'ingénierie biologique

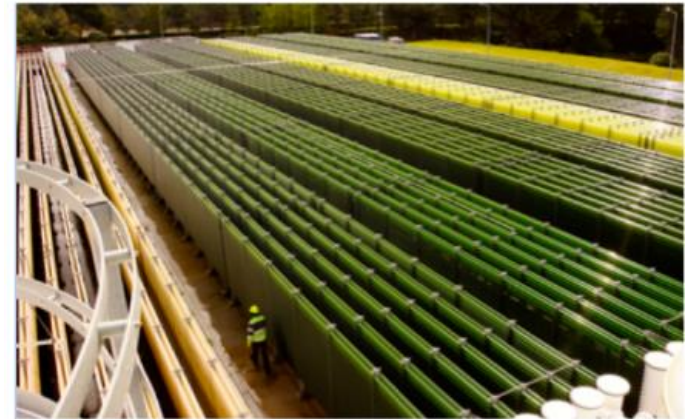
Construire des systèmes biologiques pour



Répondre à des questions fondamentales
en biologie avec de nouvelles approches
et de nouveaux concepts



Créer des systèmes artificiels pour des
applications en technologie et santé



AlgaFarm designed, built, operated by A4F
Tubular Photobioreactors > 1.300 m3

Génomomes synthétiques

Rewriting Life

In the future we won't edit genomes—we'll just print out new ones

Why redesigning the humble yeast could kick off the next industrial revolution

by Bryan Walsh February 15, 2018



Matériaux

Tissus biofabriqués, colorants textiles, bioplastiques, biobéton



Chaussures biofabriquées :
soie d'araignée synthétique



Briques de biociment produit
par des bactéries

Numérique

Stockage, biocomputing

Agro-alimentaire

Colorants, arômes, conservateurs,
enzymes, agriculture cellulaire,
génie des procédés



Transition environnementale

Biocarburants, molécules plateformes,
développement durable, bioremédiation



AlgaFarm designed, built, operated by A&F
Tubular Photobioreactors > 1,300 m3

Santé

Immunothérapie, médecine personnalisée,
cellules souches, microbiote, diagnostic, vaccins,
bioproduction de médicaments



Cosmétiques et parfums

Parfums, arômes, huiles, collagène,
squalane, chimie de spécialité



Le concept de bio-raffinerie

Crude Oil



Petroleum Refinery

Fuels

Aviation Fuel, Kerosene
Gasoline, Fuel Oil

Petrochemicals

Olefins and Aromatics for
polymers, resins, adhesives,
detergents, fibers, lubricants

Biomass
(Glucose & other simple sugars)

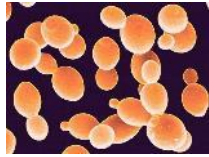


Bio-Refinery

Bio-fuels

Ethanol, Butanol
branched chain alcohols

**Value added
Bio-chemicals**



Biomass
(Glucose & other simple sugars)



Biorefinery

Bio-fuels

Ethanol, Butanol
branched chain alcohols

Value added

Bio-chemicals



SUGARCANE

CO_2



Algal biorefinery

Bio-fuels

Ethanol, Butanol
branched chain alcohols

Value added

Bio-chemicals

Une source d'énergie abondante, renouvelable et pérenne ?

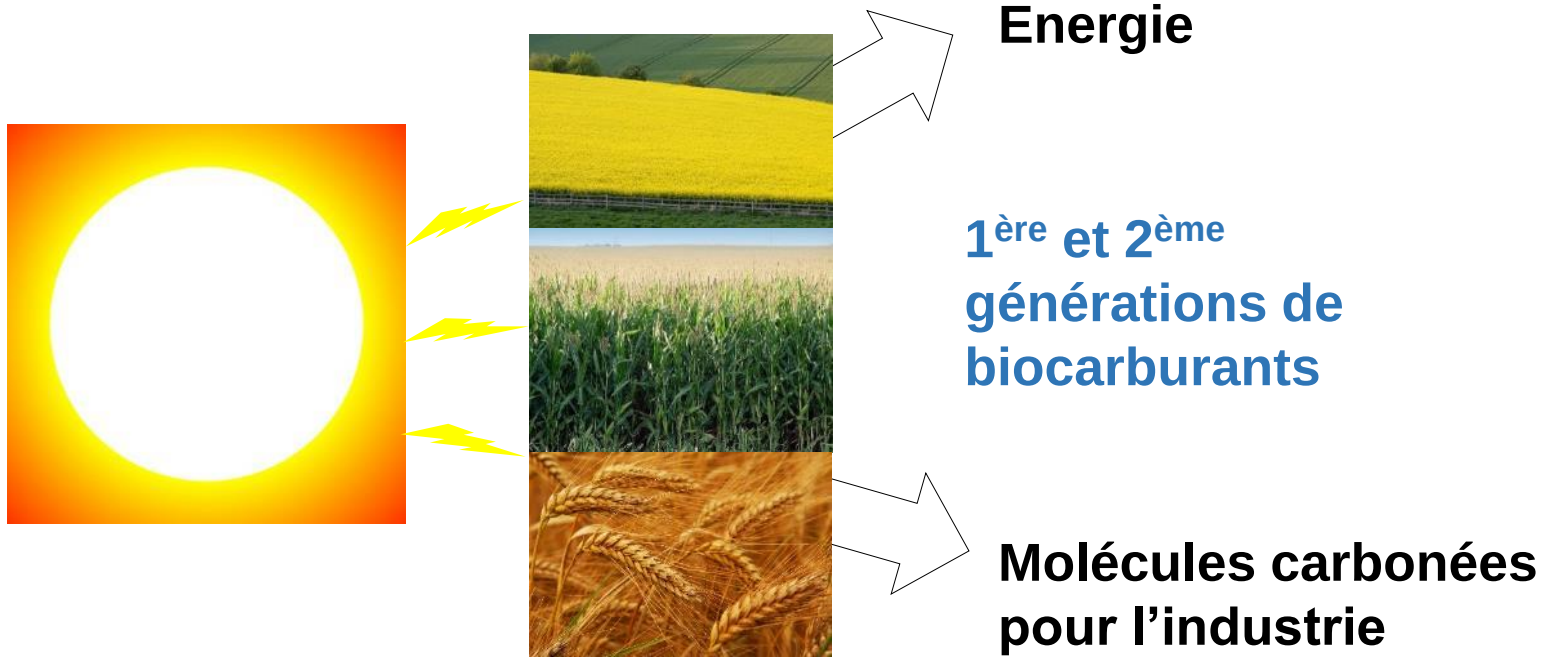
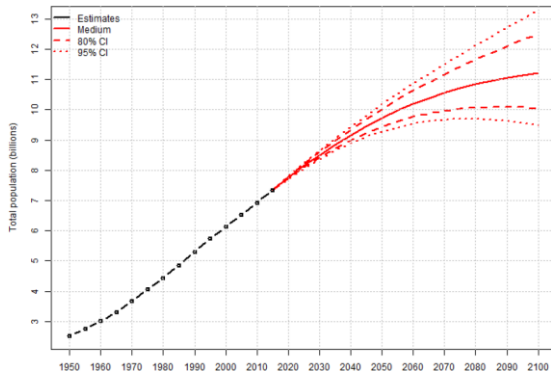


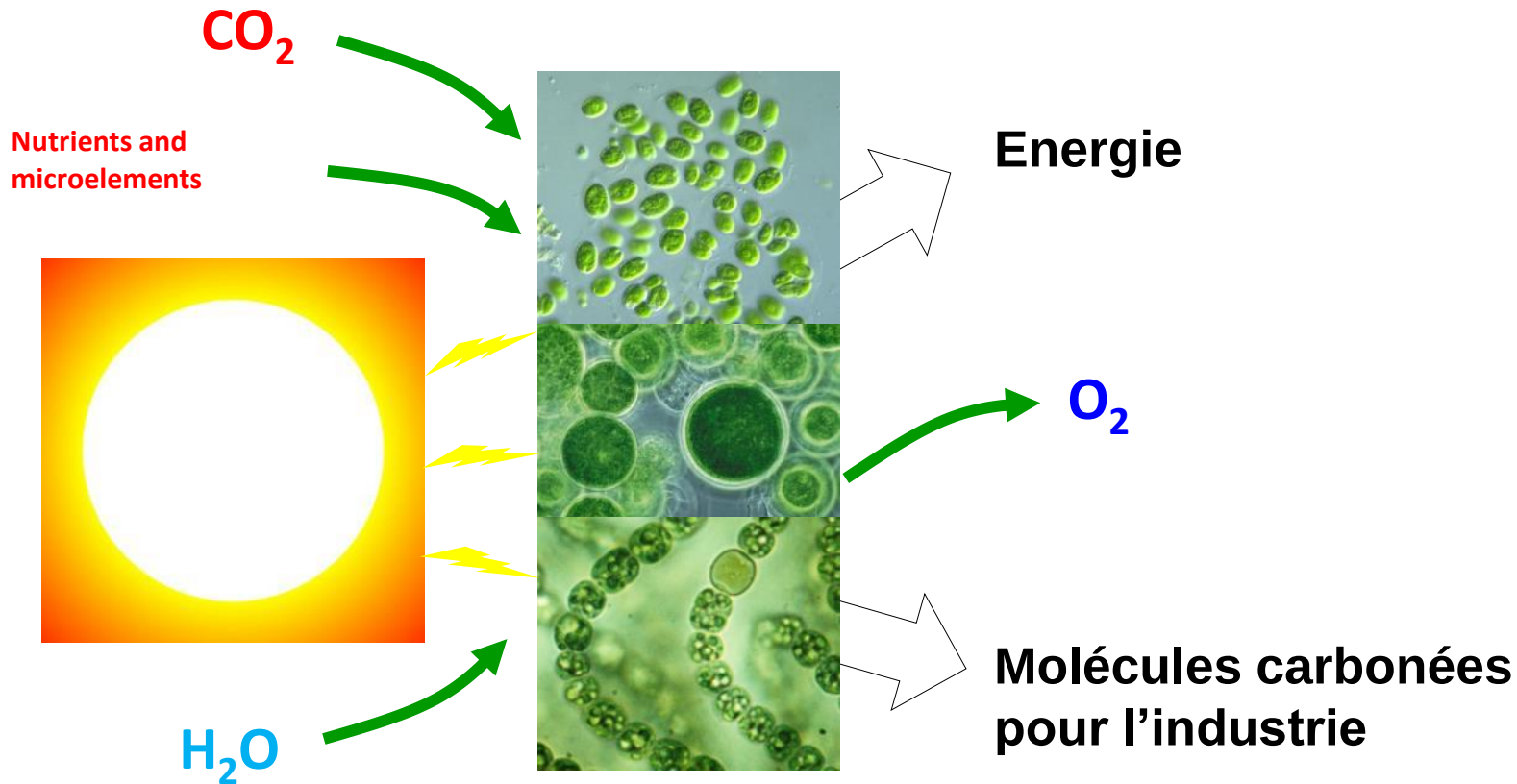
Figure 2. Population of the world: estimates, 1950-2015, medium-variant projection and 80 and 95 per cent confidence intervals, 2015-2100



Source: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). *World Population Prospects: The 2015 Revision*. New York: United Nations.

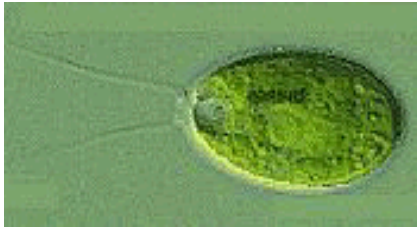
- ➔ **Compétition avec l'agriculture**
- ➔ **Demande de nourriture augmente.**

Une source d'énergie abondante, renouvelable et pérenne ?



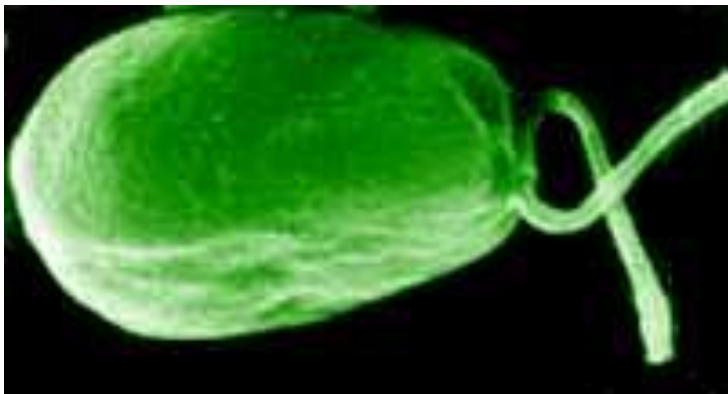
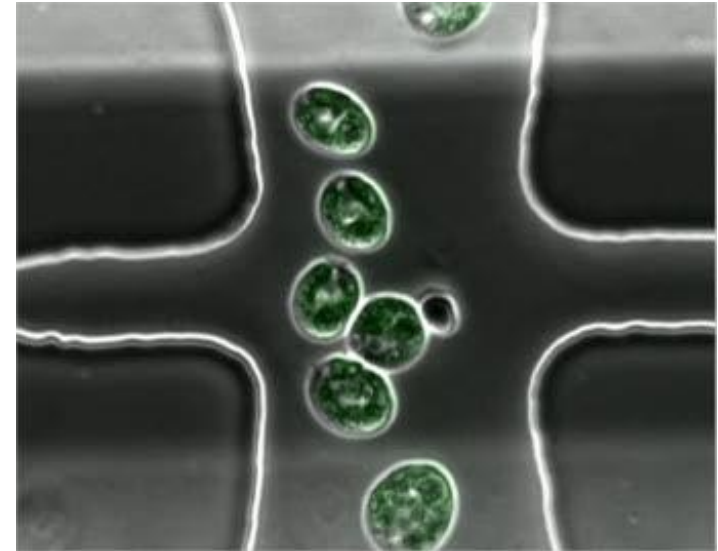
Microalgues: algues vertes, diatomées, cyanobactéries...

⇒ Ces microorganismes photosynthétique constituent une plateforme biotechnologique de production renouvelable à très fort potentiel pour l'industrie.

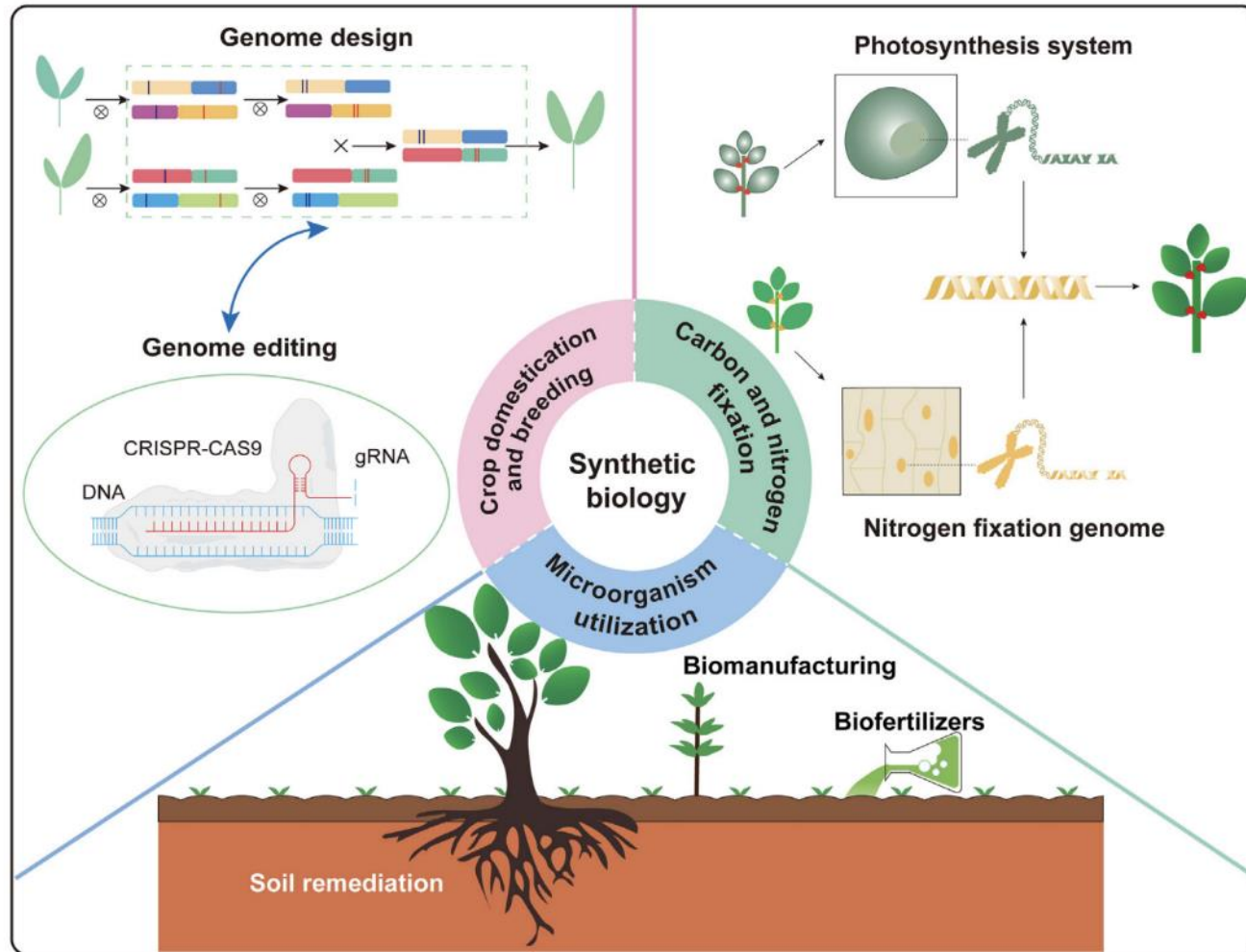


Chlamydomonas reinhardtii

- Algue verte eucaryote unicellulaire
- Appareil photosynthétique similaire aux plantes
- Photosynthèse facultative: croissance sur acétate
- Organisme haploïde: facilite la génétique
- Techniques de microbiologie standard, croissance rapide
- Trois génomes séquencés et annotés

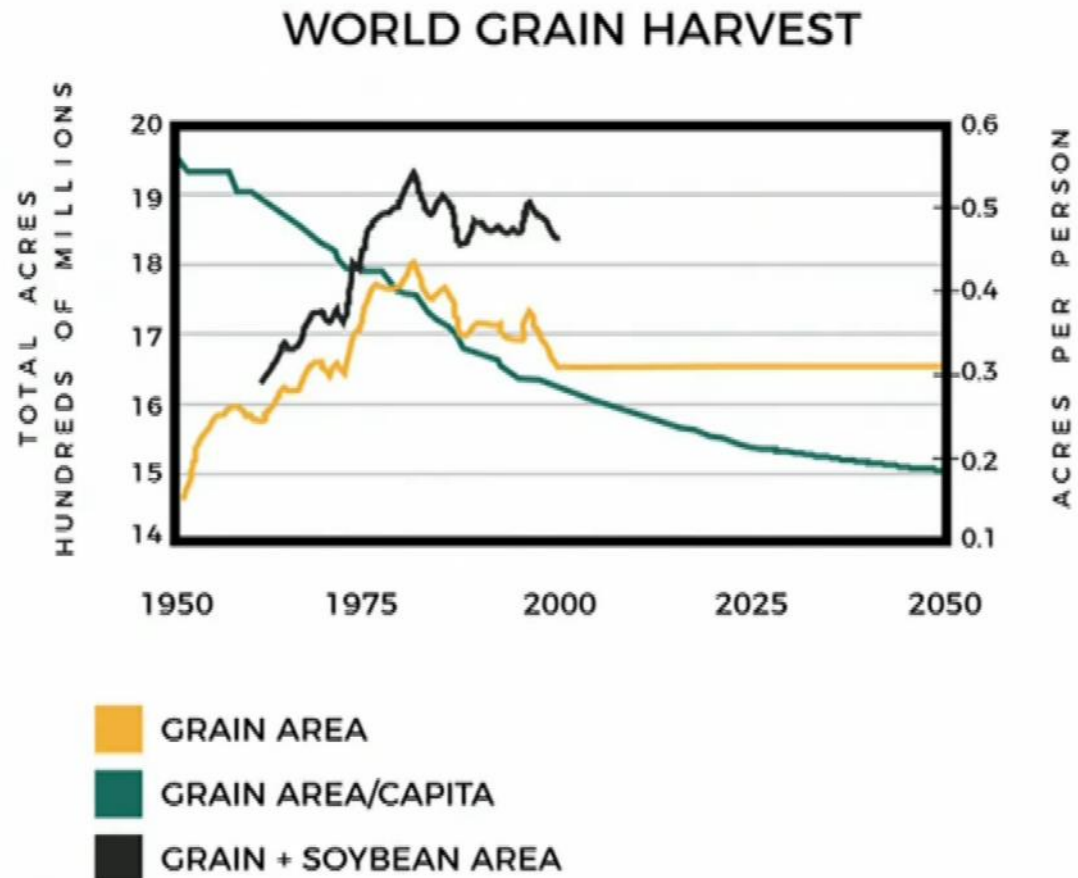


Biologie synthétique et agriculture

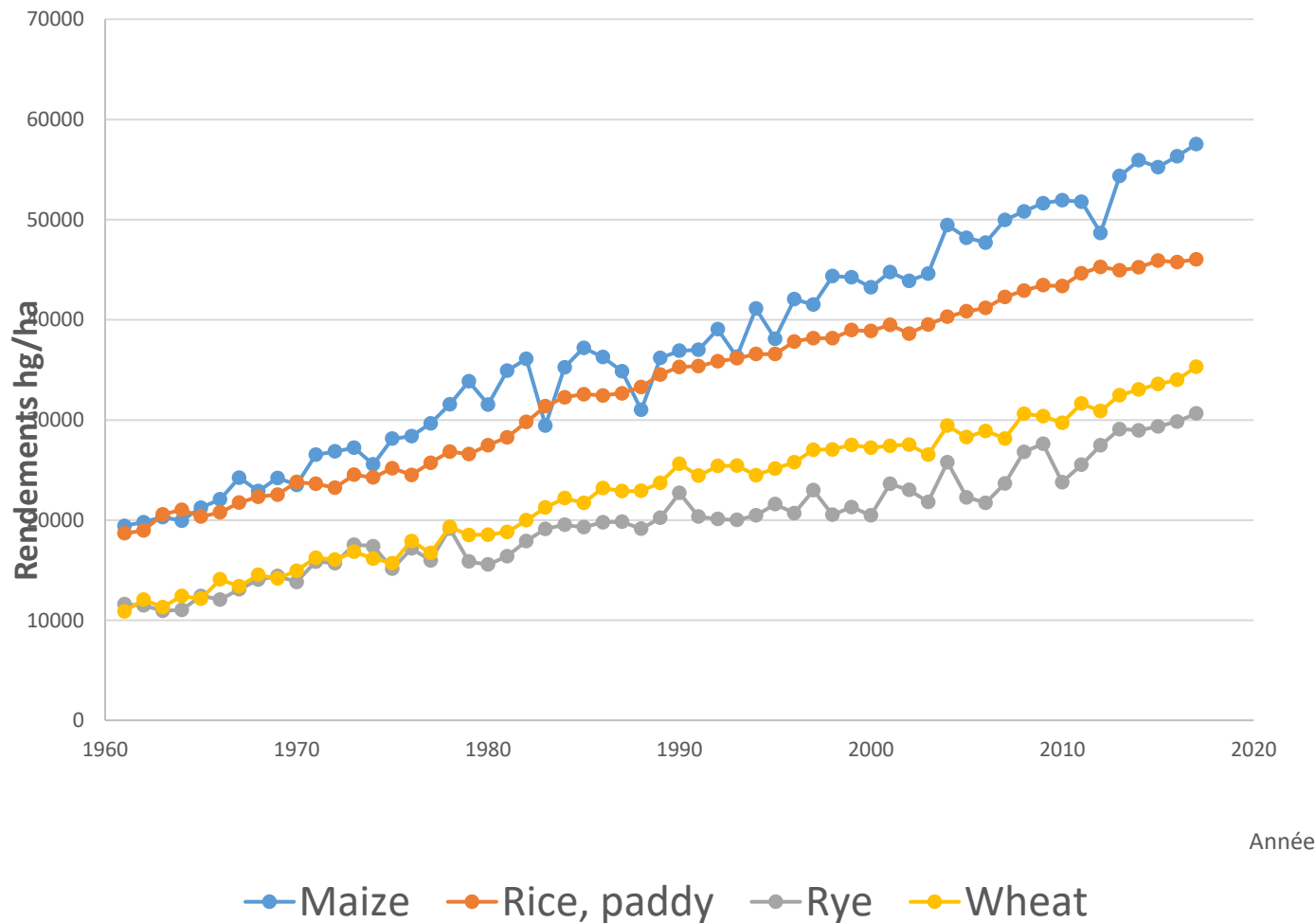


Selon les prévisions de l'ONU, pour répondre à la demande agricole de 2050-2070,

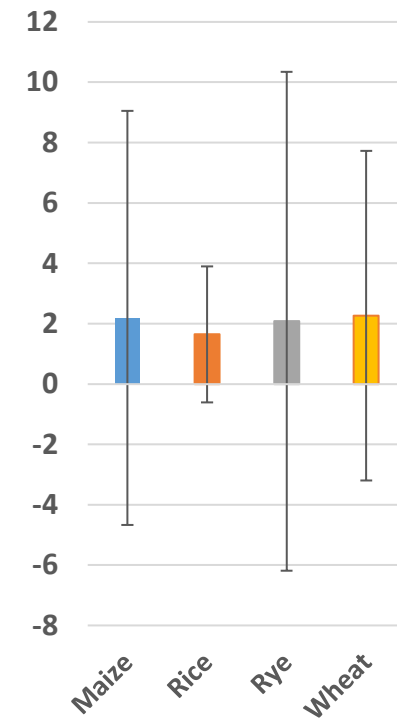
nous devons **doubler** la production agricole annuelle.



Evolution du Rendement des cultures céréalières (monde)

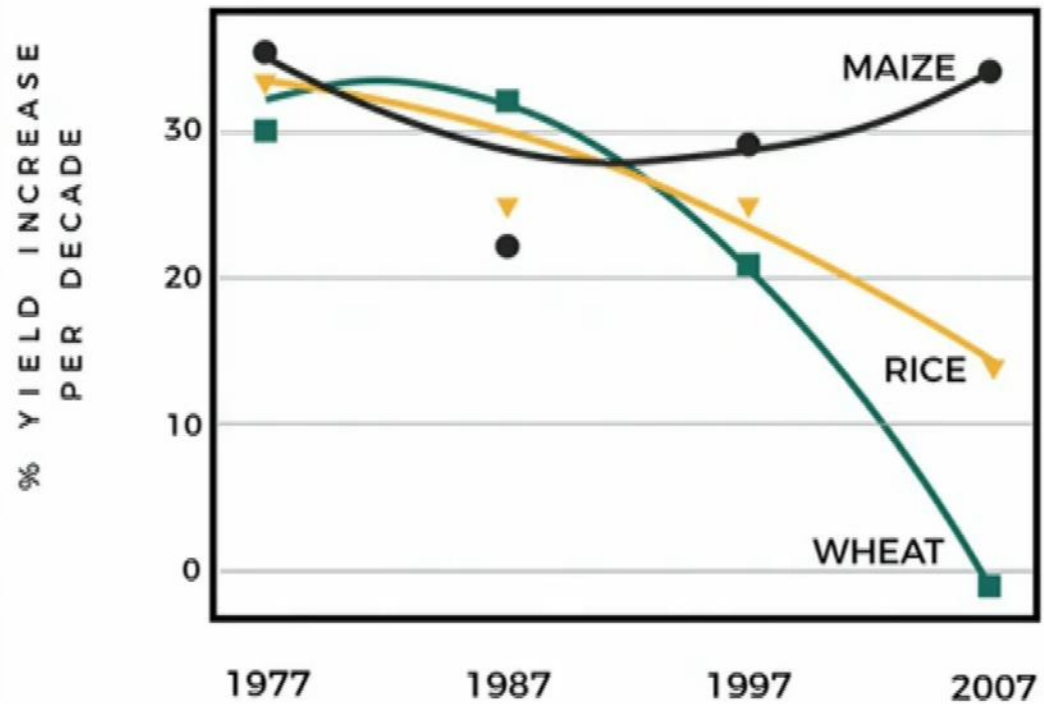


Moyenne ($\pm$ SD) de l'évolution annuelle du rendement (%)



Mais les gains de rendement sont en baisse

WORLD GRAIN PRODUCTION



YIELD POTENTIAL EQUATION

$$W_h = S \epsilon_i \epsilon_c \eta$$

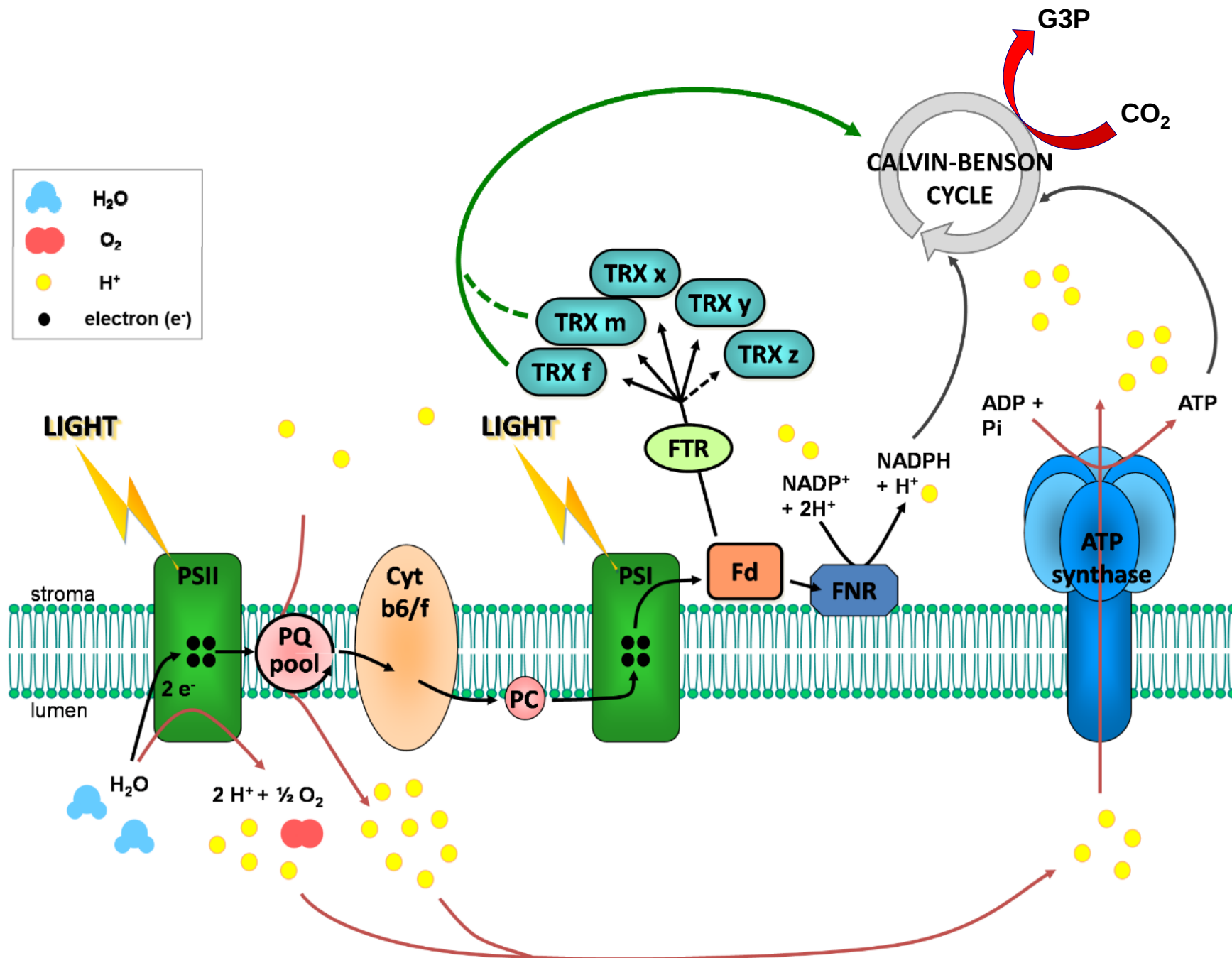
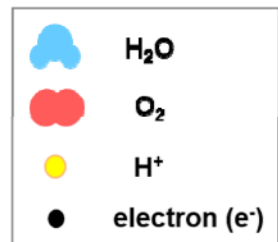
YIELD
POTENTIAL

TOTAL SOLAR
ENERGY

INTERCEPTION
EFFICIENCY

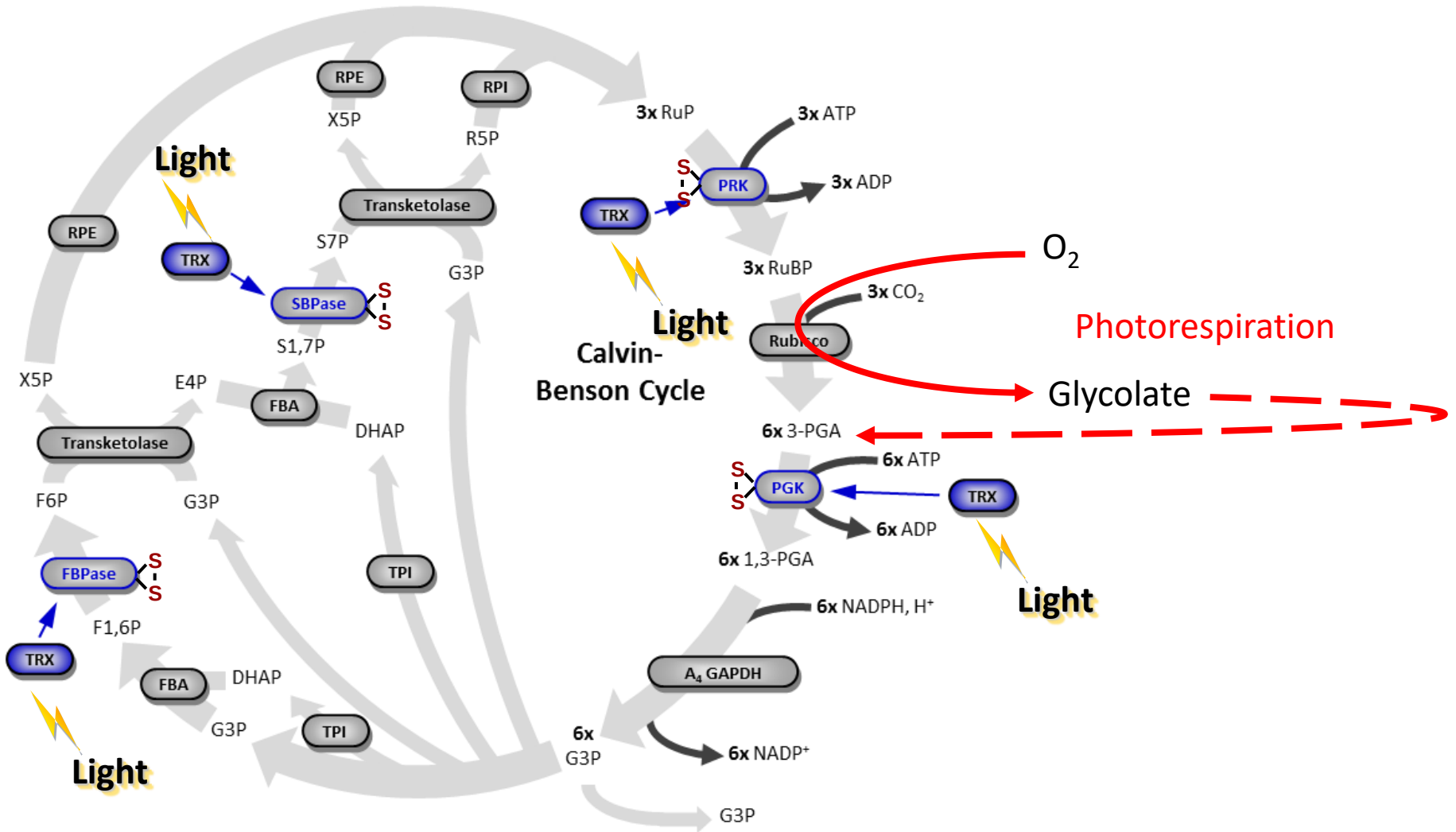
CONVERSION
EFFICIENCY

PARTITIONING
EFFICIENCY

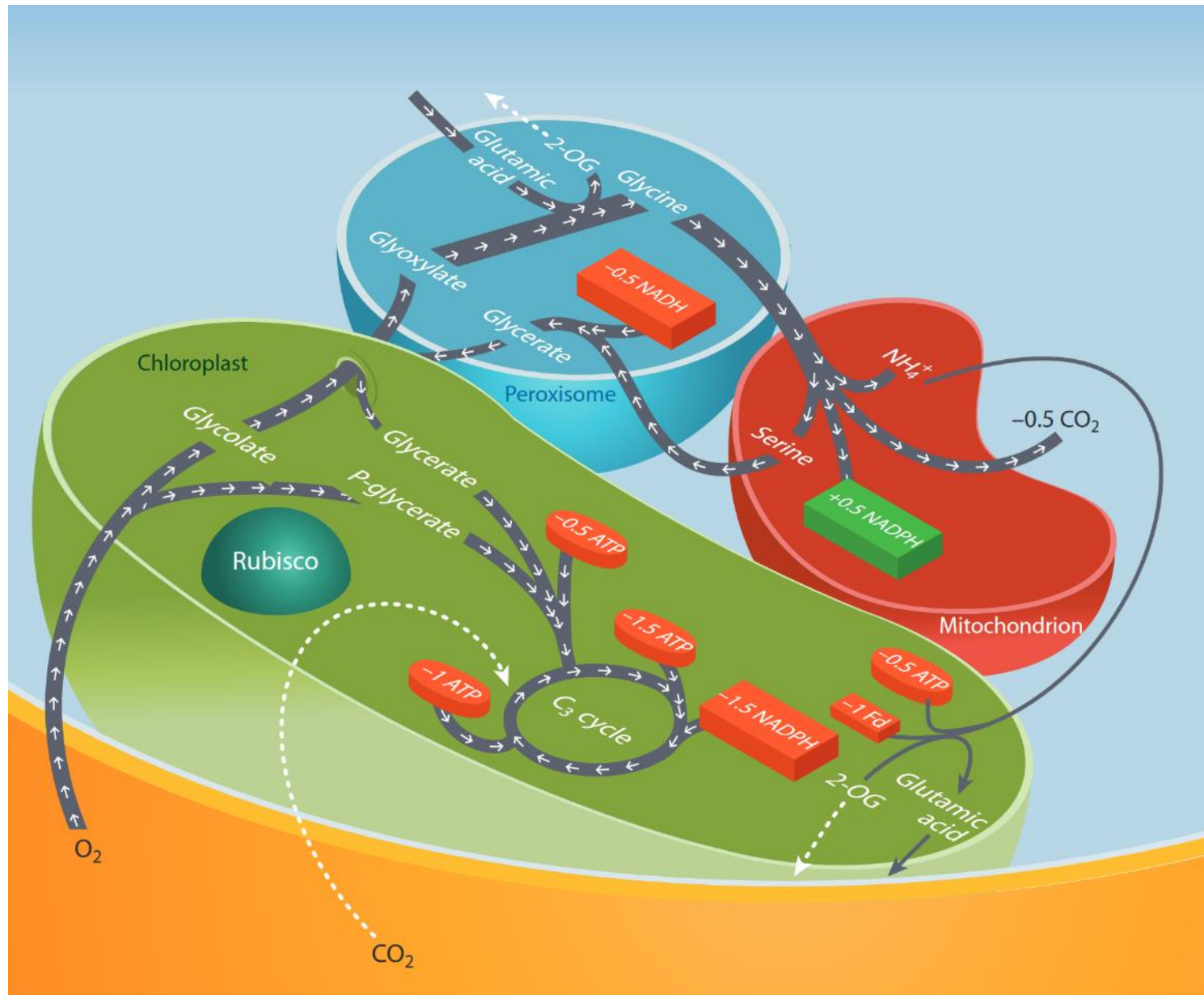


Cycle de Calvin-Benson

13 étapes
11 enzymes



Photorespiration



$$W_h = S \epsilon_i \epsilon_c \eta$$

YIELD
POTENTIAL

TOTAL SOLAR
ENERGY

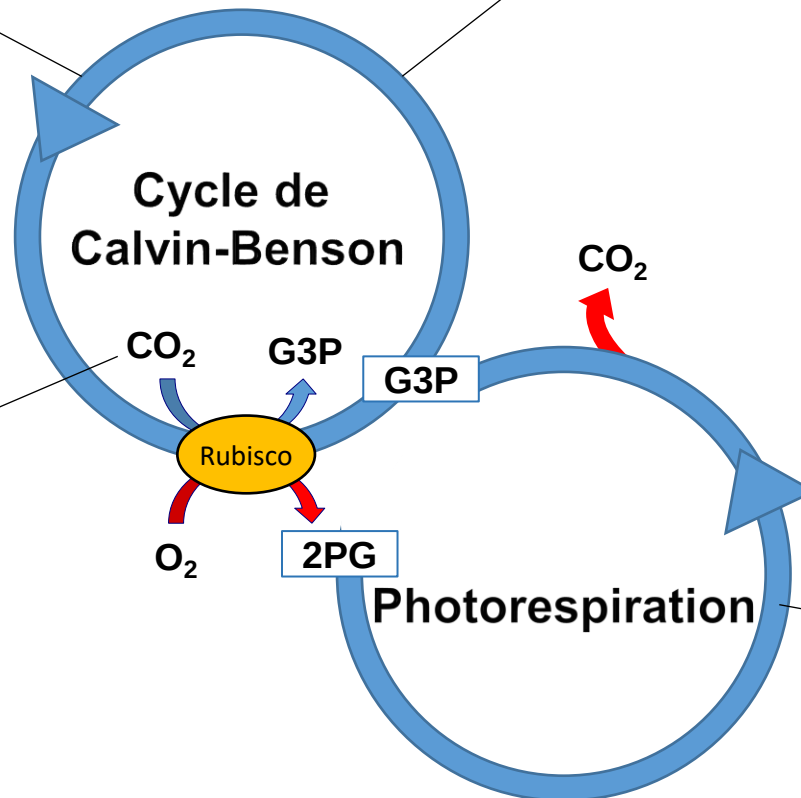
INTERCEPTION
EFFICIENCY

CONVERSION
EFFICIENCY

PARTITIONING
EFFICIENCY

Améliorer l'efficacité du
cycle de Calvin-Benson

Construire des voies
artificielles de fixation du
carbone



Mécanismes
synthétiques de
concentration du
carbone

Court-circuit synthétique
de la photorespiration

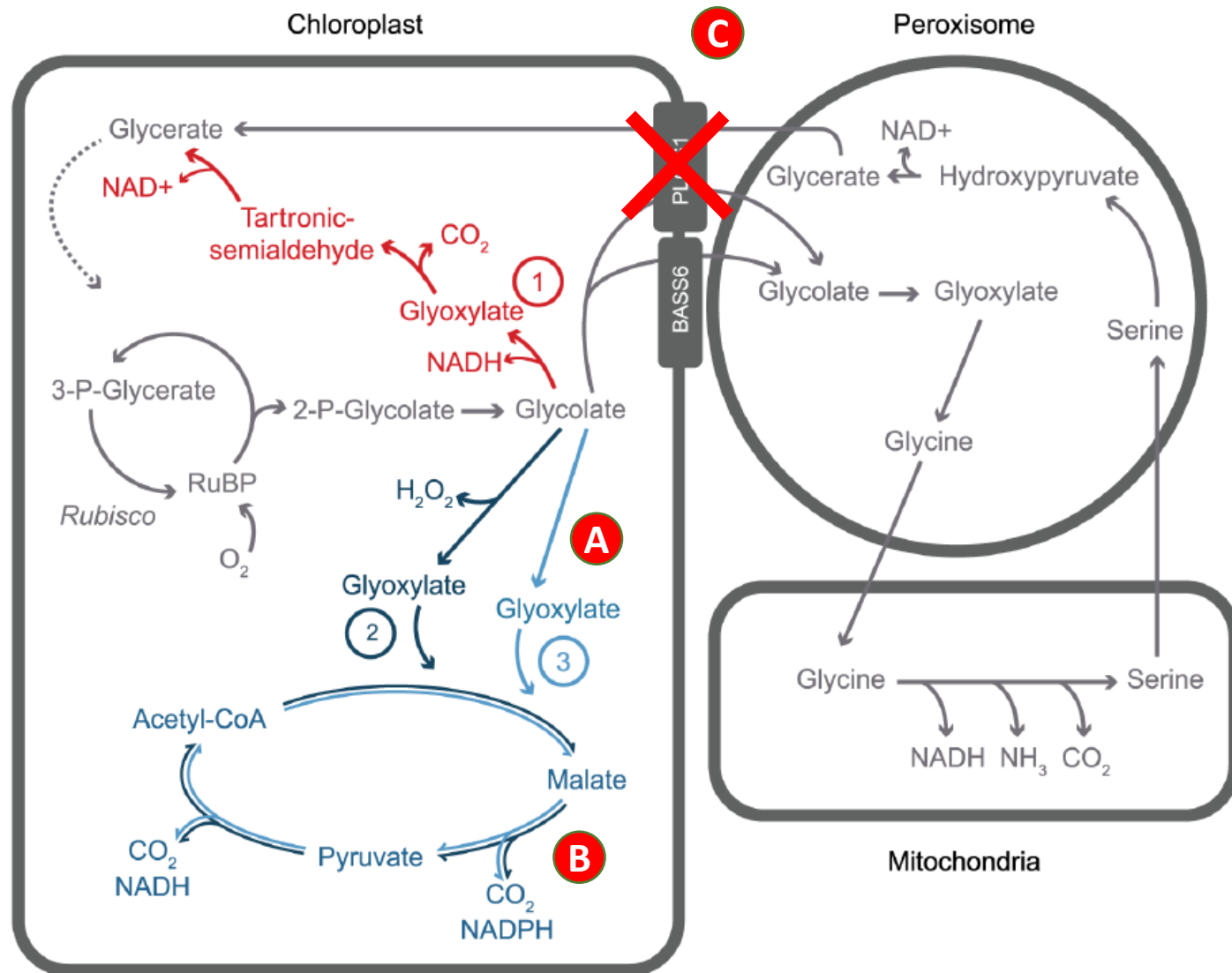
Court-circuiter la photorespiration

Solution 3 « AP3 »:

A- *Chlamydomonas reinhardtii*
glycolate
dehydrogenase

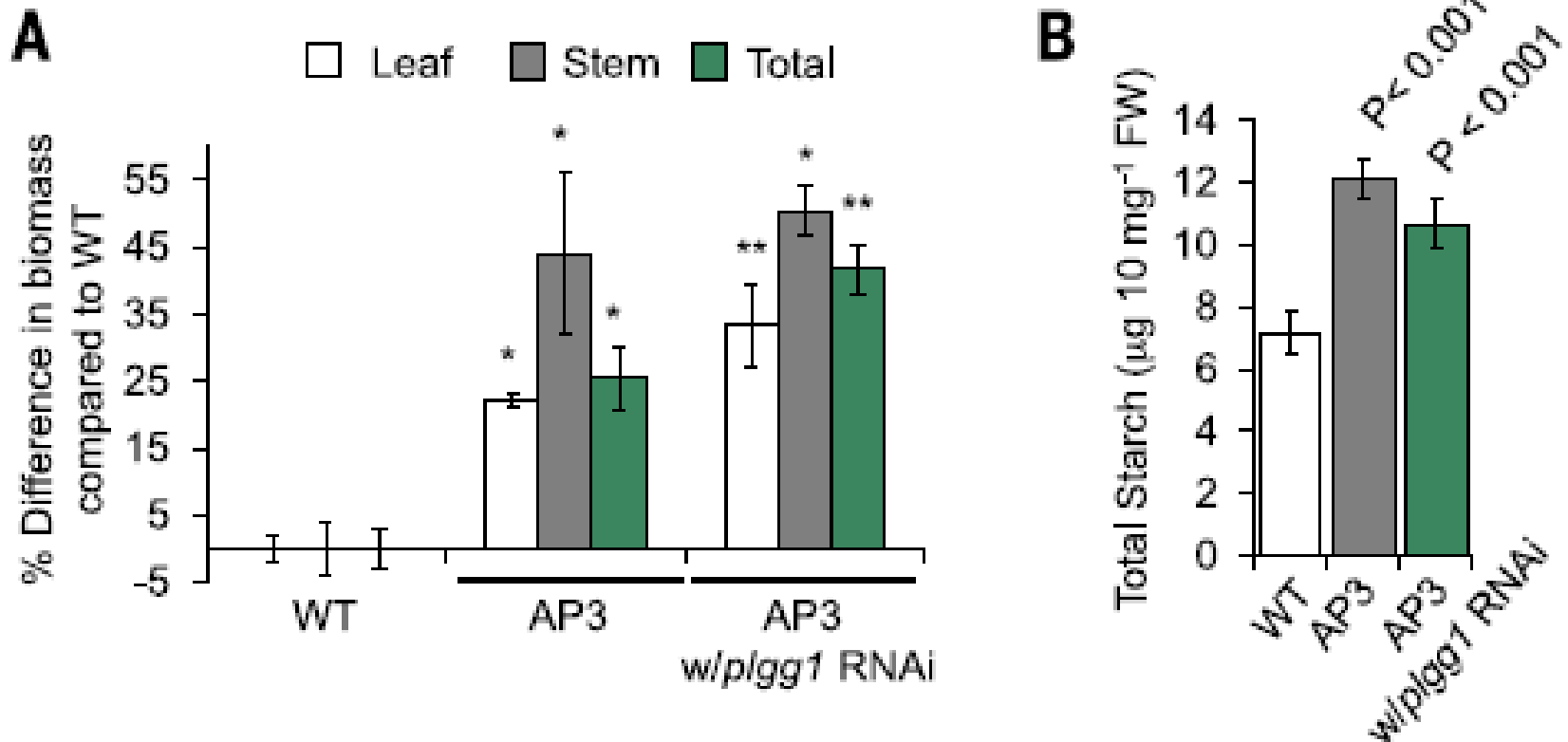
B- *Cucurbita maxima*
malate synthase

C- RNAi contre PLGG1



Court-circuiter la photorespiration

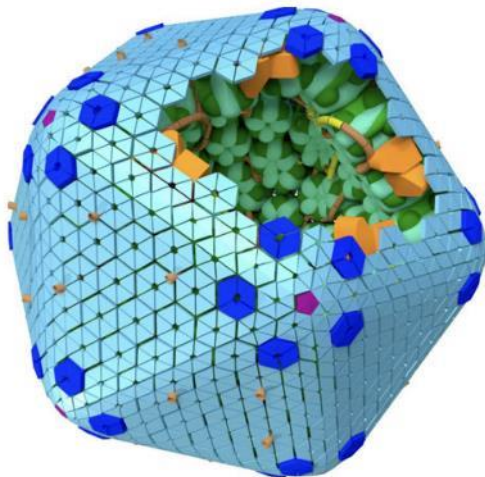
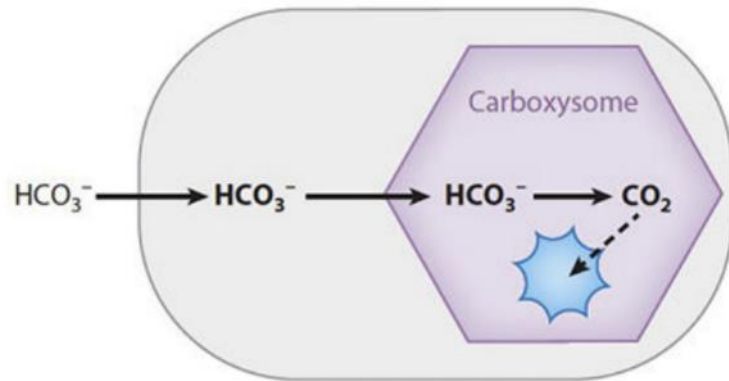
Plantes en champs



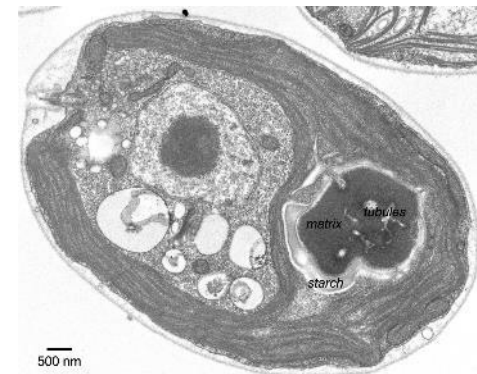
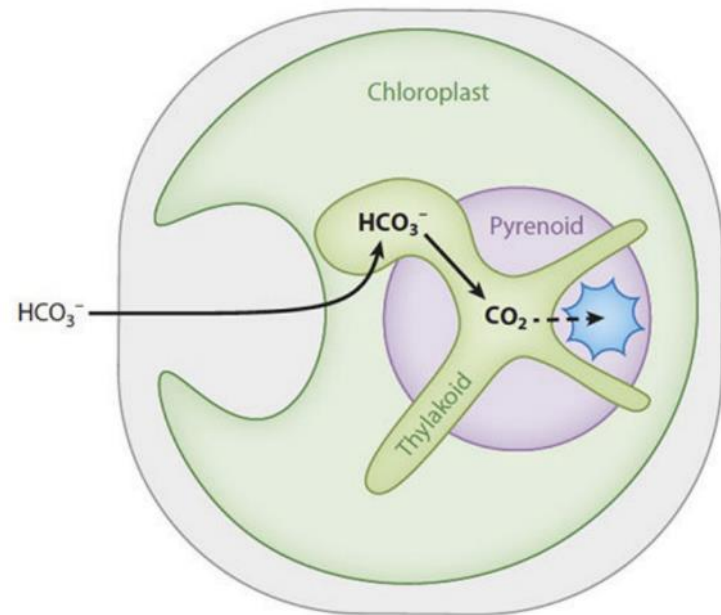
Plant productivity and photosynthetic performance in 2017 field trials.

Concentration du carbone

Cyanobactéries: carboxysomes

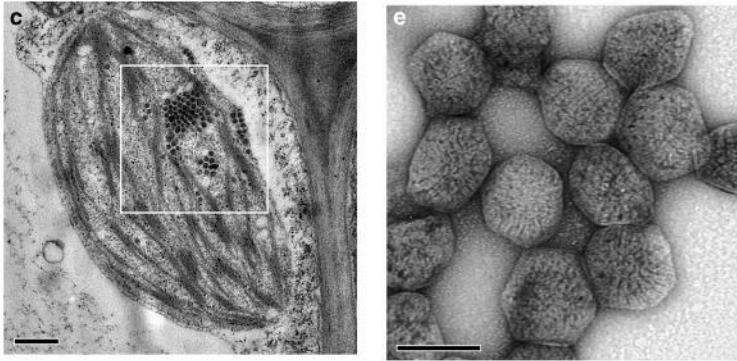


Algues: pyrénolide

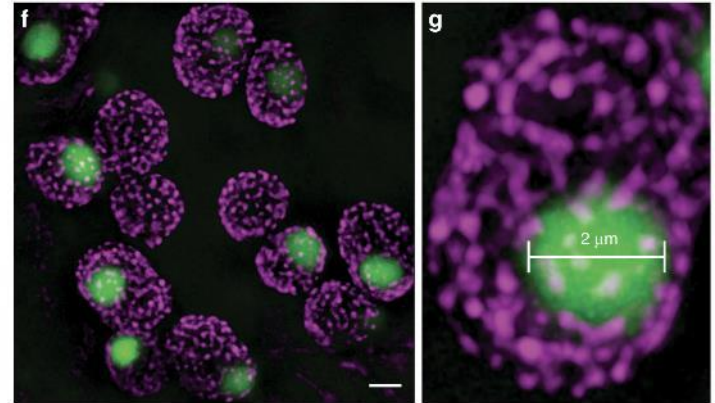


Concentration du carbone

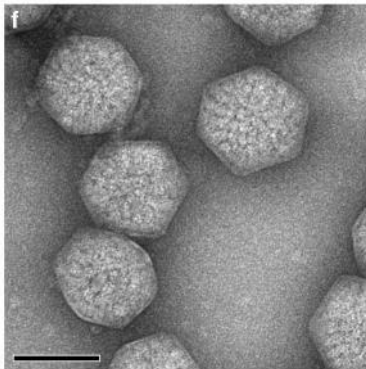
**Carboxysome synthétique
minimal chez le tabac**



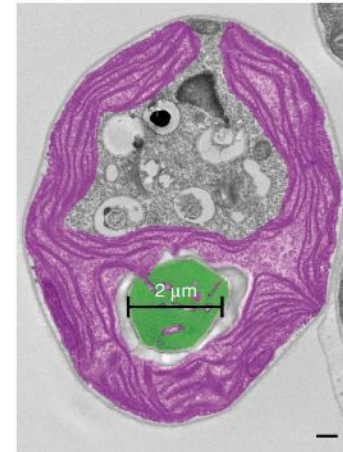
**Pyrénoïde synthétique minimal
chez Arabidopsis**



**Carboxysome naturel de
Cyanobium marinum PCC7001**

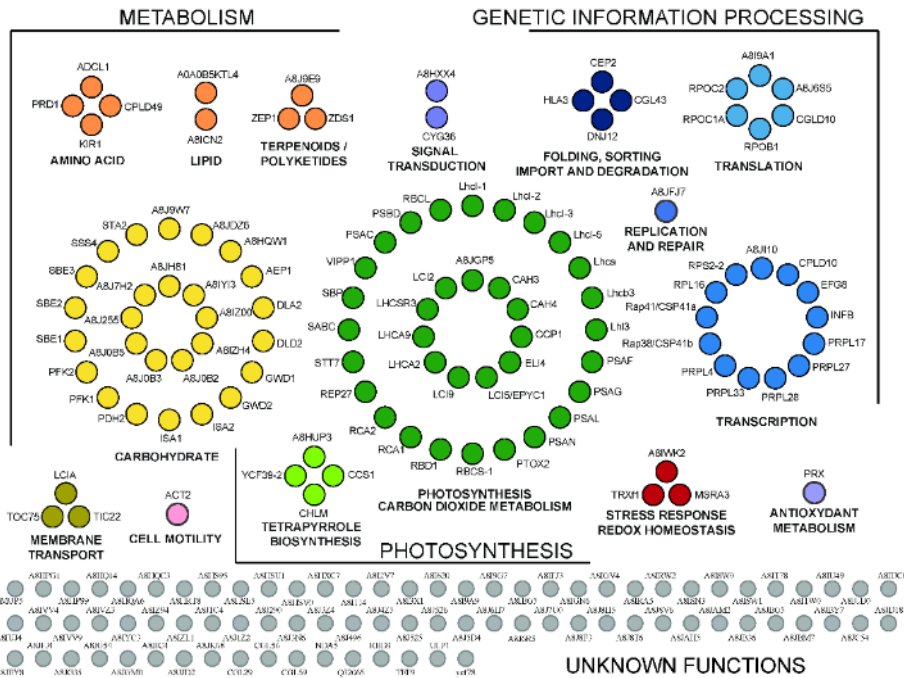


**Pyrénoïde naturel de
*Chlamydomonas reinhardtii***

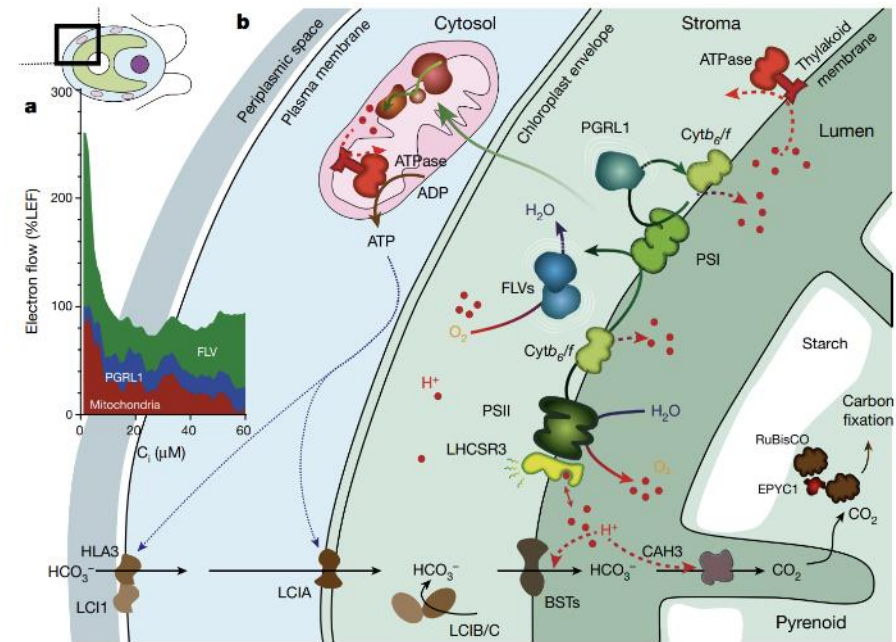


Concentration du carbone: une machinerie complexe

Le protéome du pyrénioïde: 190 protéines



Une machinerie coordonnée sur de multiples compartiment



Améliorer le cycle de Calvin-Benson

Surexpression SBPase

Blé

+40% Biomasse et poids grains

Driever et al. 2017 Phil Soc Trans

Surexpression SBPase+FBA

Tabac

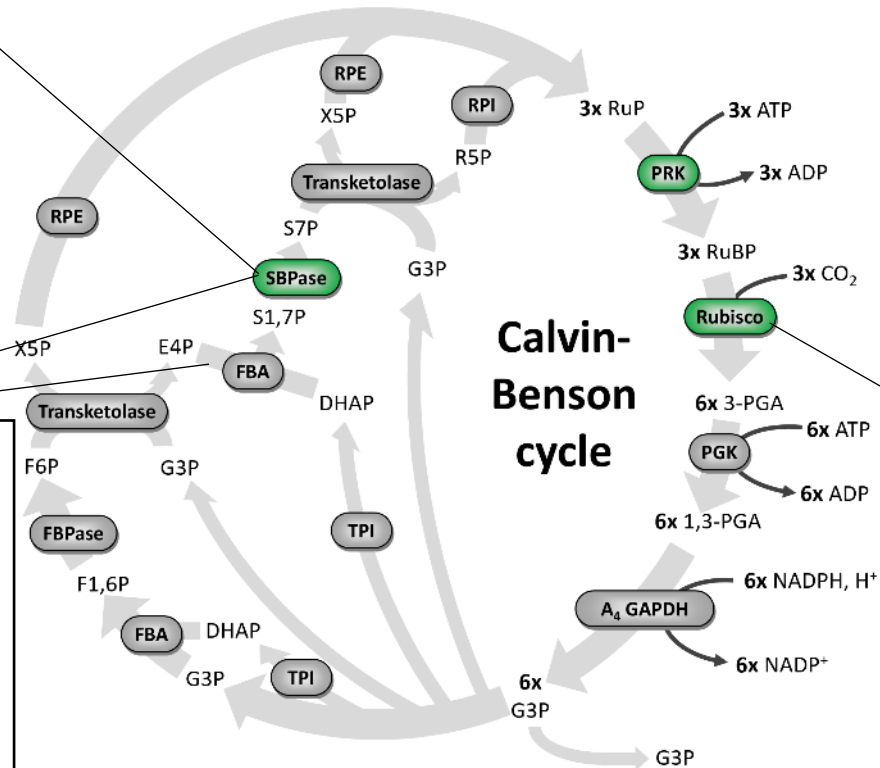
+62% DW

Simkin et al. 2017 J. Exp. Bot

Arabidopsis

+71% DW

Simkin et al. 2015 Plant Biotechnol J.



Surexpression Rubisco

Riz

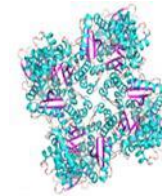
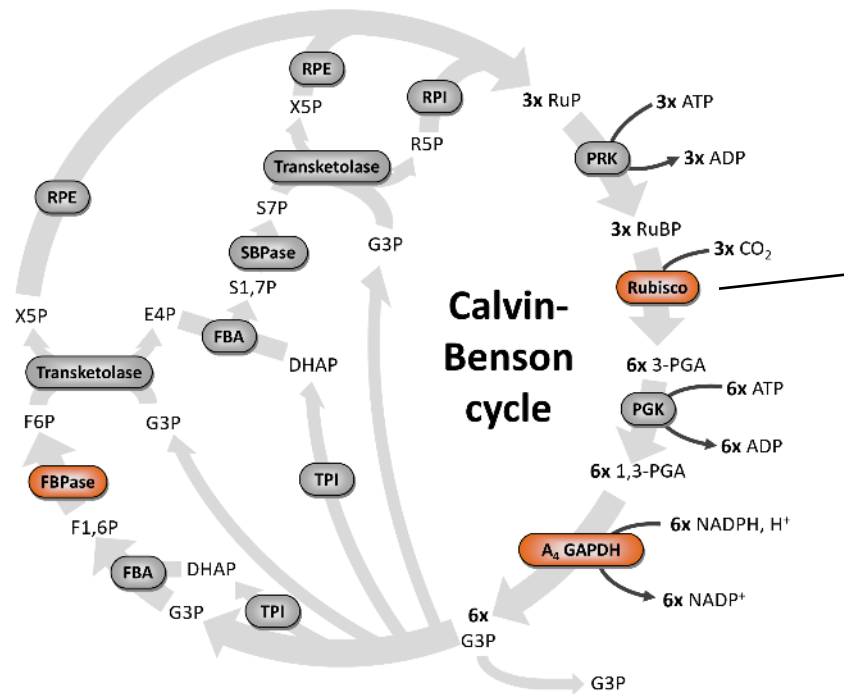
+30% DW

Wang et al. 2020 Nat Food

Mais

+30% DW

Salesee-Smith 2020 Nat Commun



Rubisco
Taylor et al. 2001 JBC



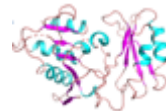
Ribulose-5-phosphate 3-epimerase

Unpublished, PDB: 7b1w



Ribose-5-phosphate isomerase

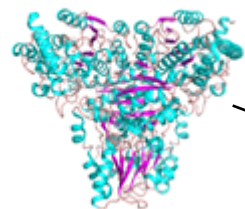
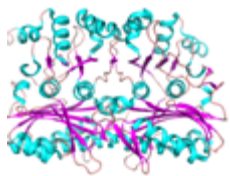
Le Moigne et al. 2020 IJMS



Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

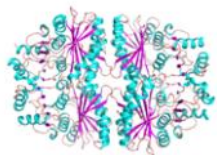
Güttele et al. 2016 PNAS

Unpublished, PDB: 7b2o



Transketolase

Pasquani et al. 2017 BBA



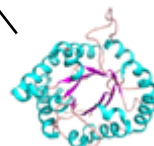
Fructose-1,6-bisphosphatase

Model



Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

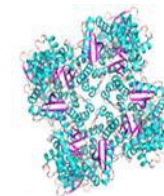
Le Moigne et al. 2022 J Struct Biol



Triose phosphate isomerase

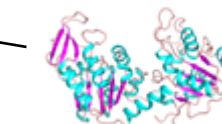
Zaffagnini et al. 2014 Mol Plant

Calvin-Benson cycle



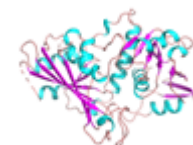
Rubisco

Taylor et al. 2001 JBC



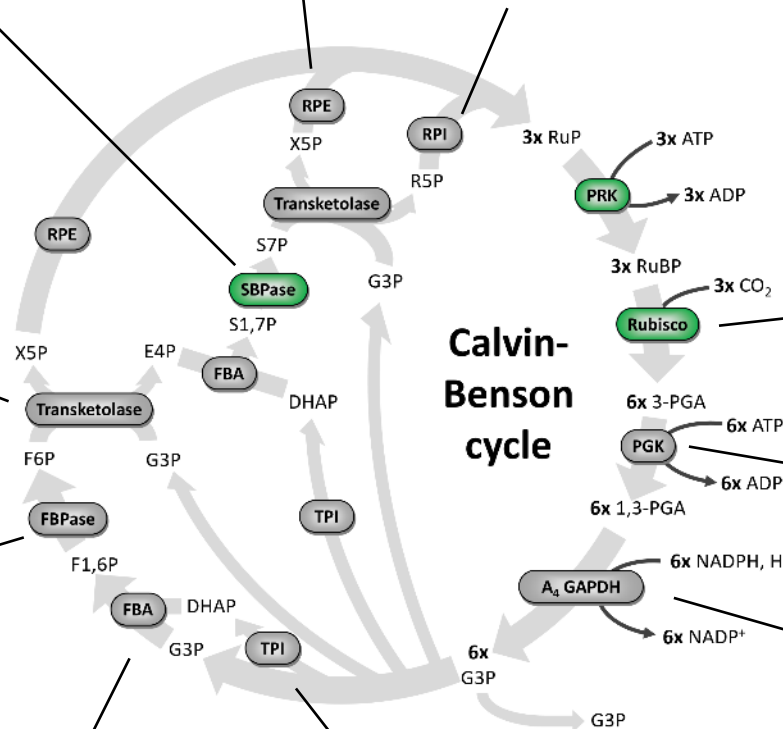
Phosphoglycerate kinase

Unpublished



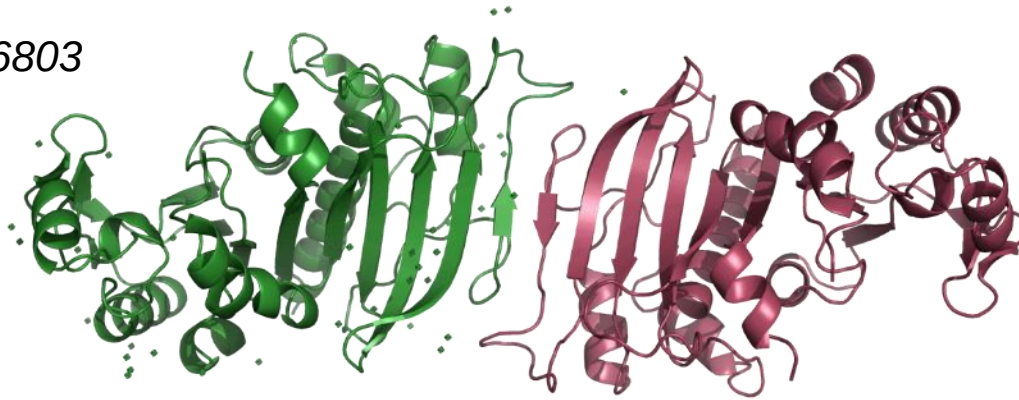
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Unpublished

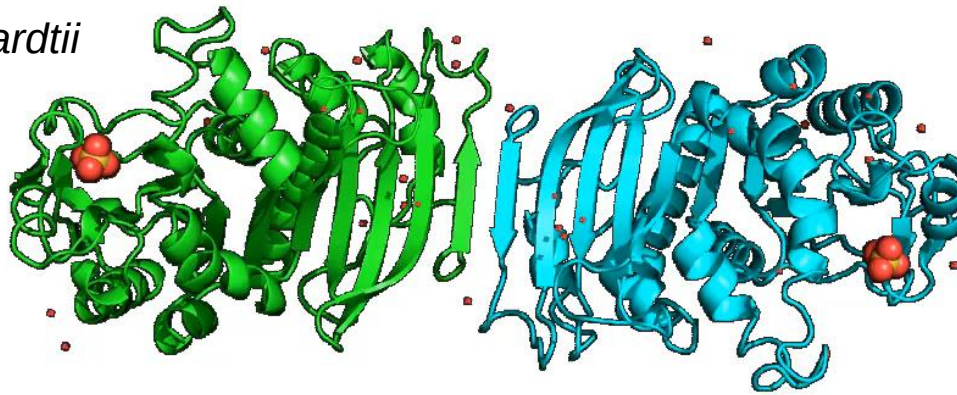


Structures cristallographiques de 3 homodimères de PRK

Synechocystis PCC6803

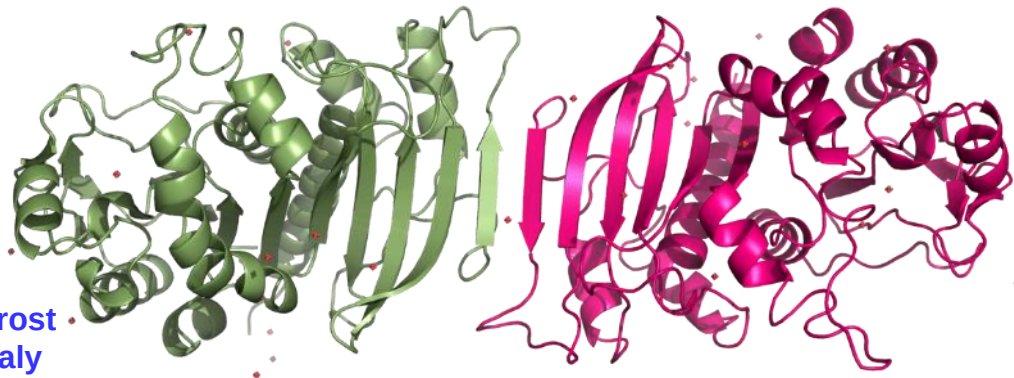


Chlamydomonas reinhardtii



Aligned to *Synechocystis*:
RMSD=0.852Å

Arabidopsis thaliana



Aligned to *Synechocystis*:
RMSD=0.738Å

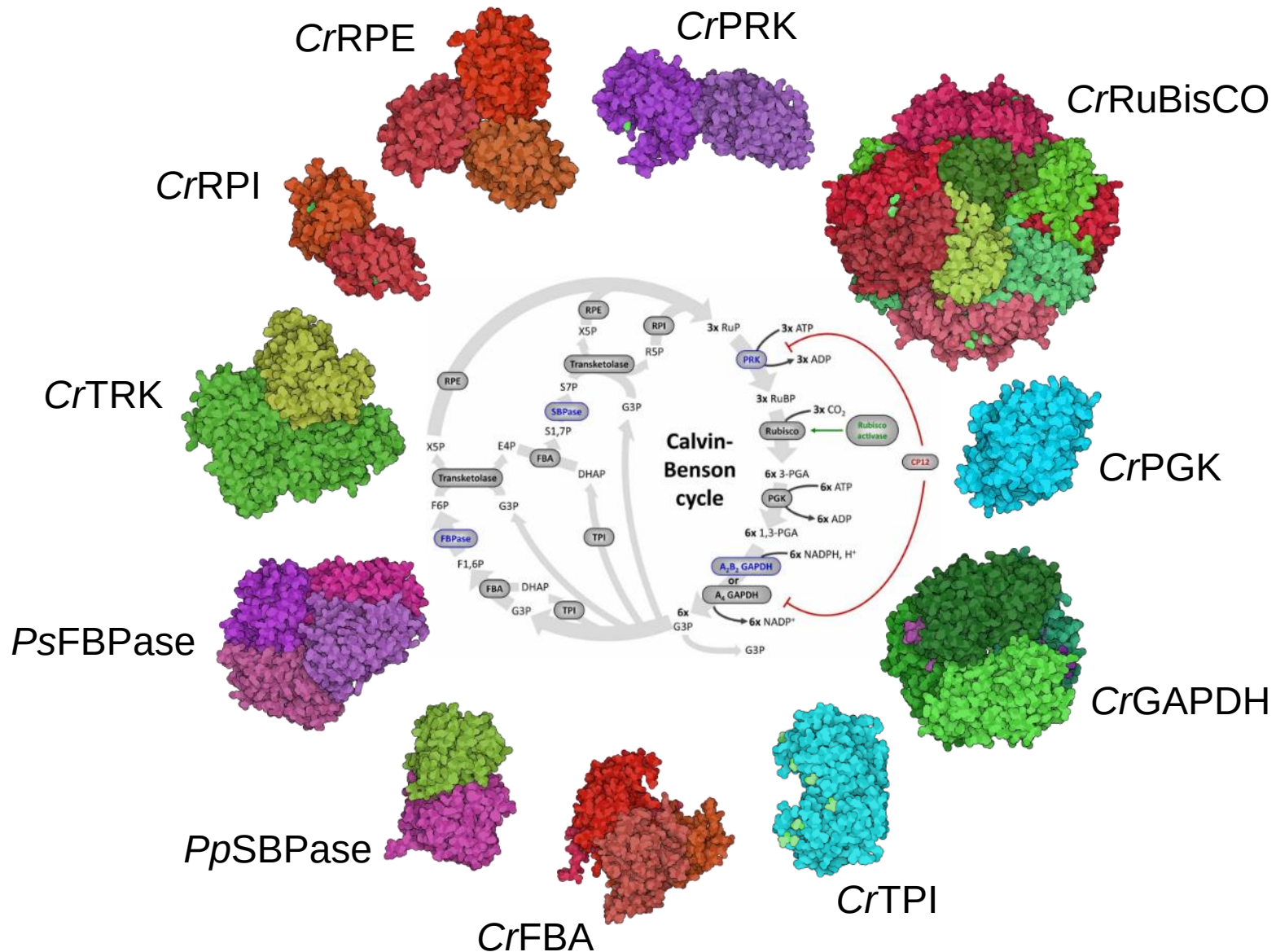
Aligned to *Chlamydomonas*:
RMSD=0.561Å

Collaboration

Simona Fermani, Paolo Trost
University of Bologna, Italy

Gurrieri et al. 2019 **PNAS**
Henri et al. in preparation

Description des 11 enzymes à l'échelle atomique

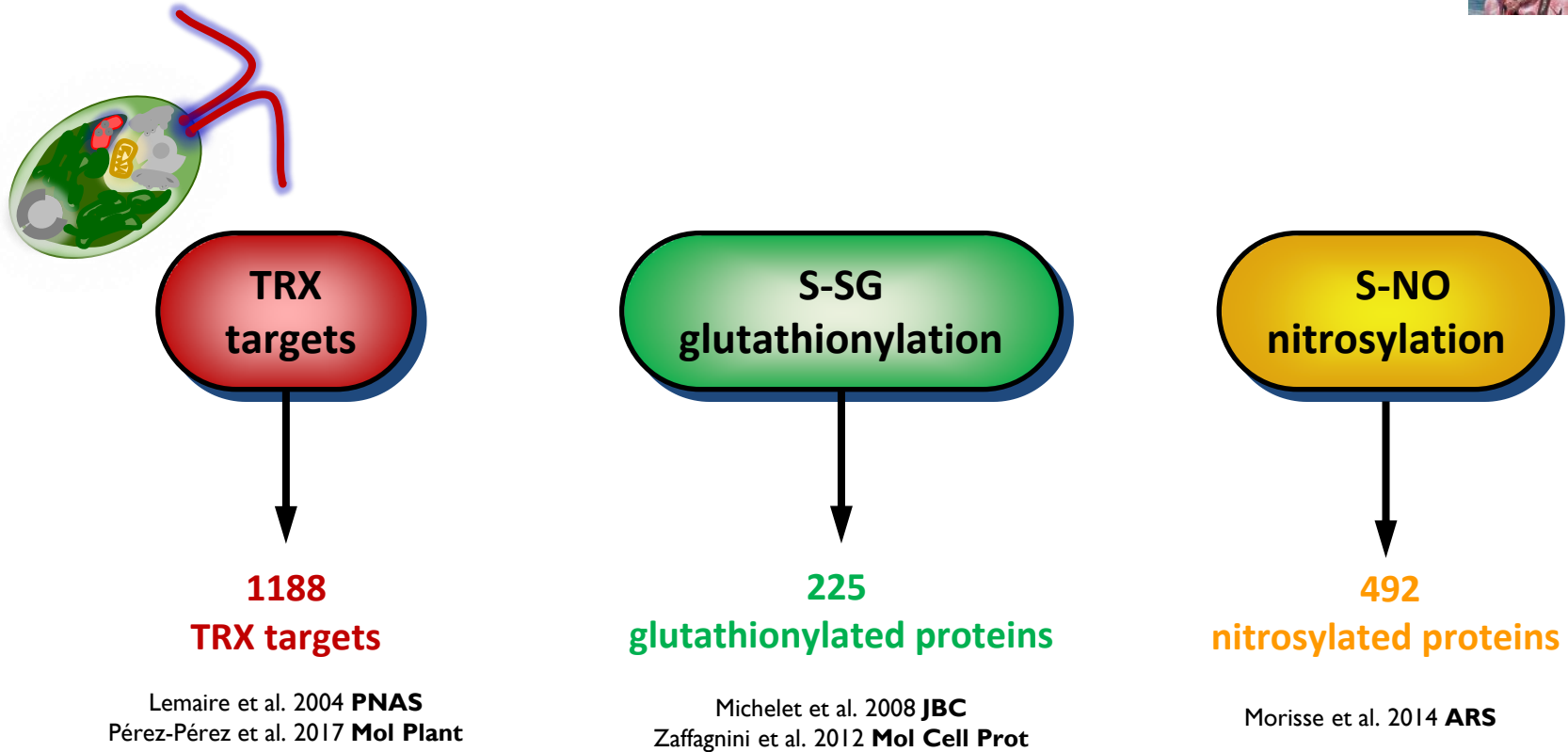


Modification redox des protéines chez *Chlamydomonas*

Project Leader

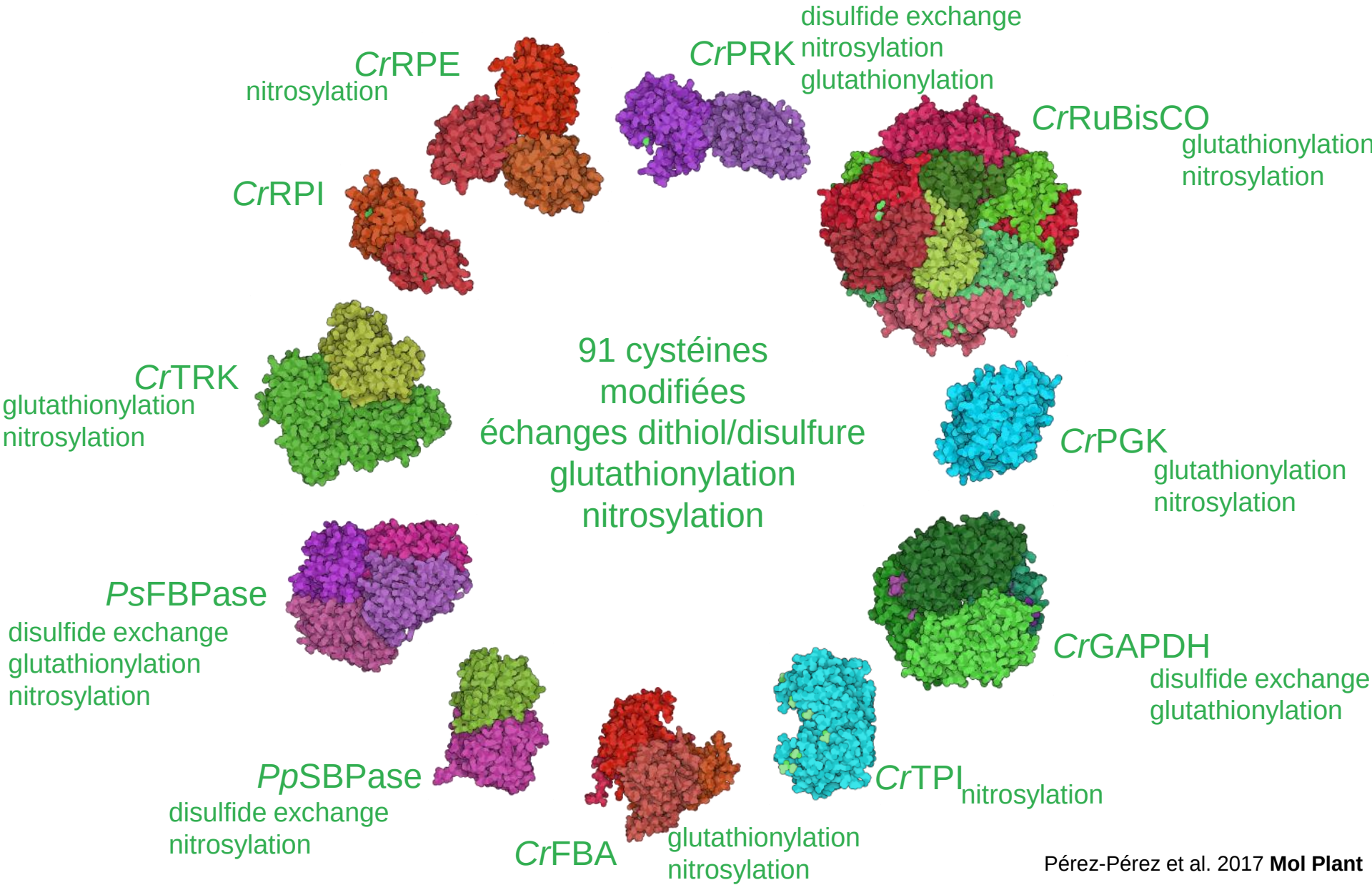


Christophe
Marchand
IR1 CNRS



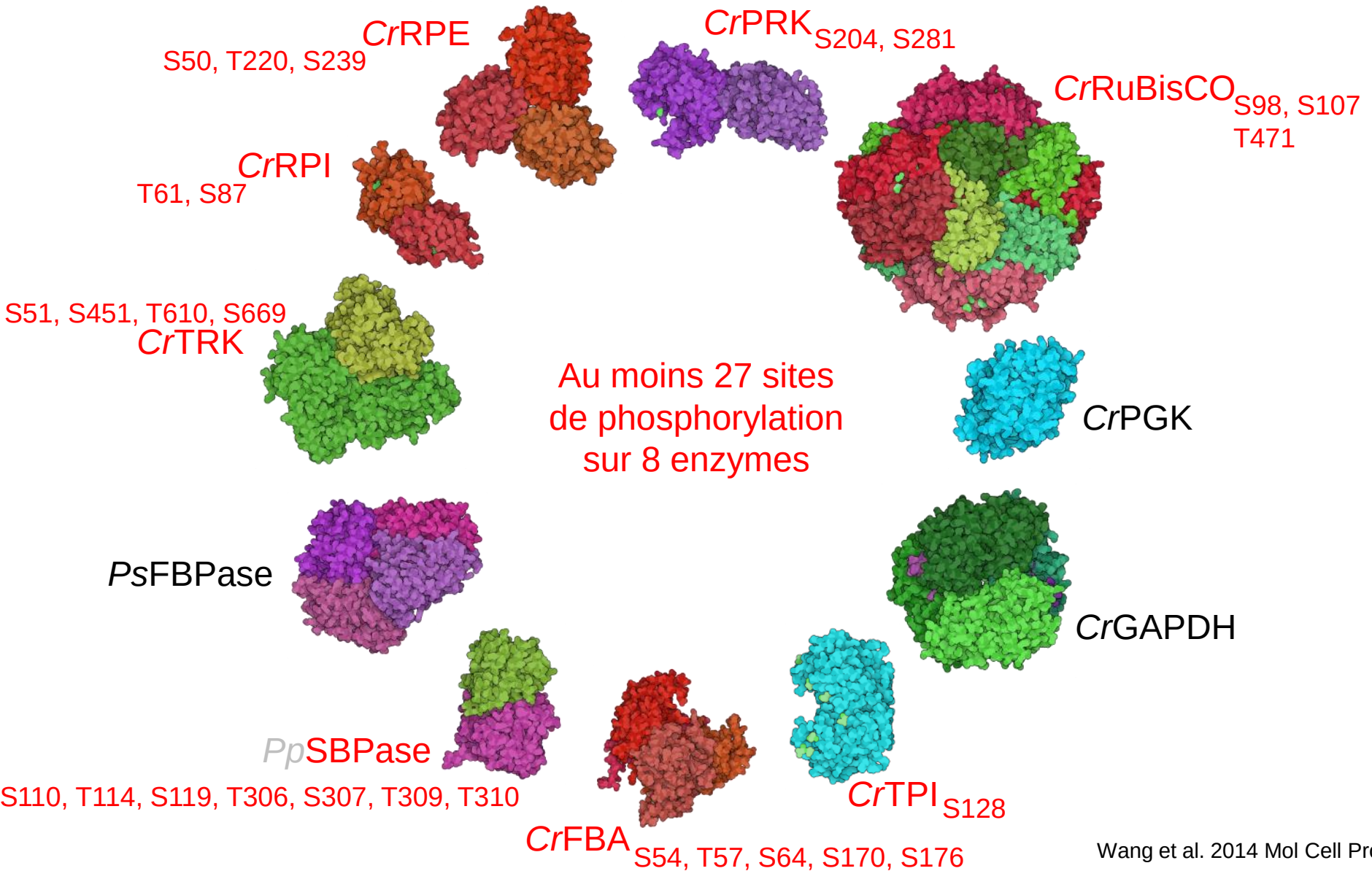
Régulation multi-échelle du cycle de Calvin-Benson

Modifications redox post-traductionnelles



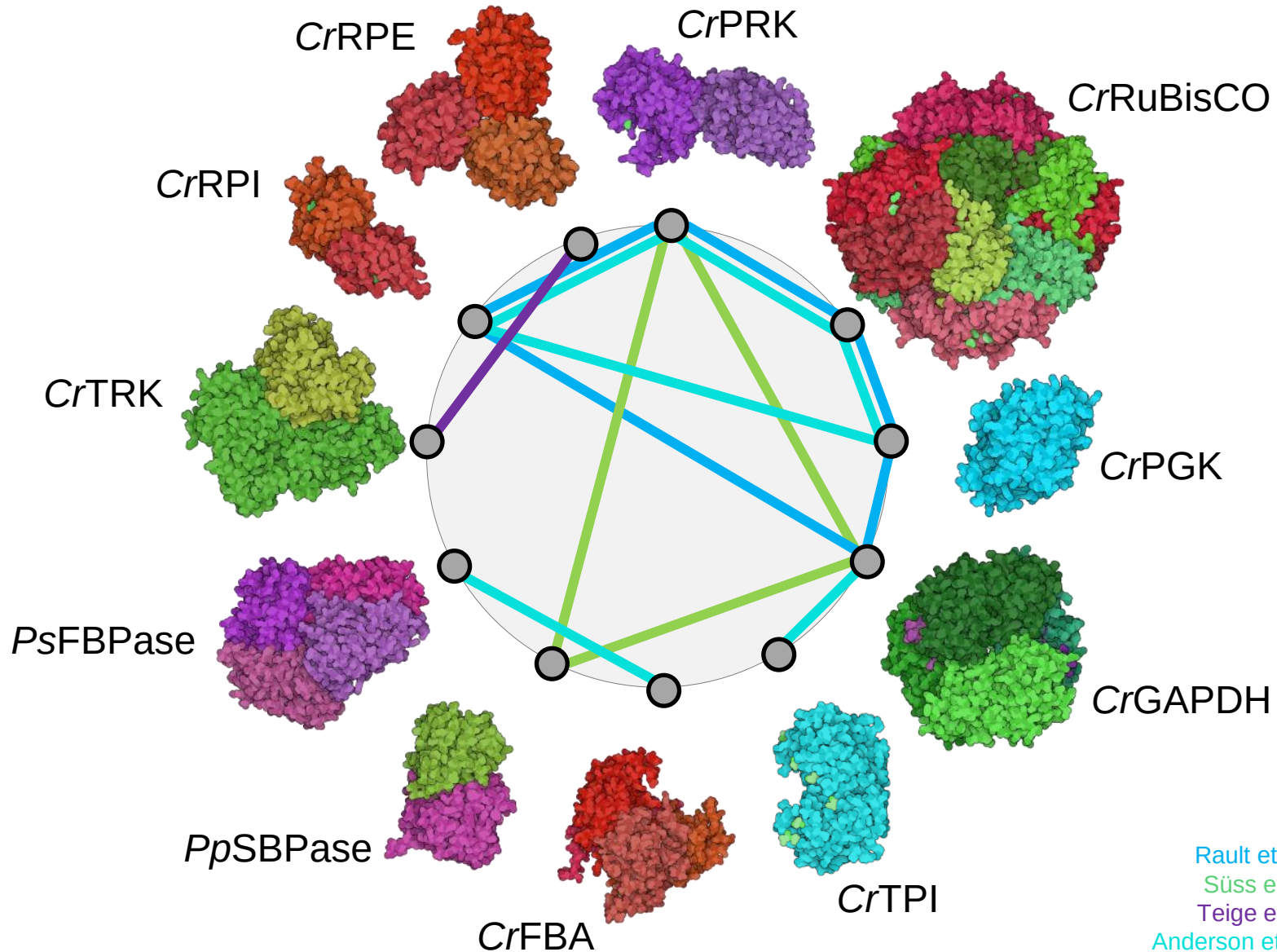
Régulation multi-échelle du cycle de Calvin-Benson

Phosphorylations



Régulation multi-échelle du cycle de Calvin-Benson

Complexes multi-protéiques



Rault et al. EurJB 1993

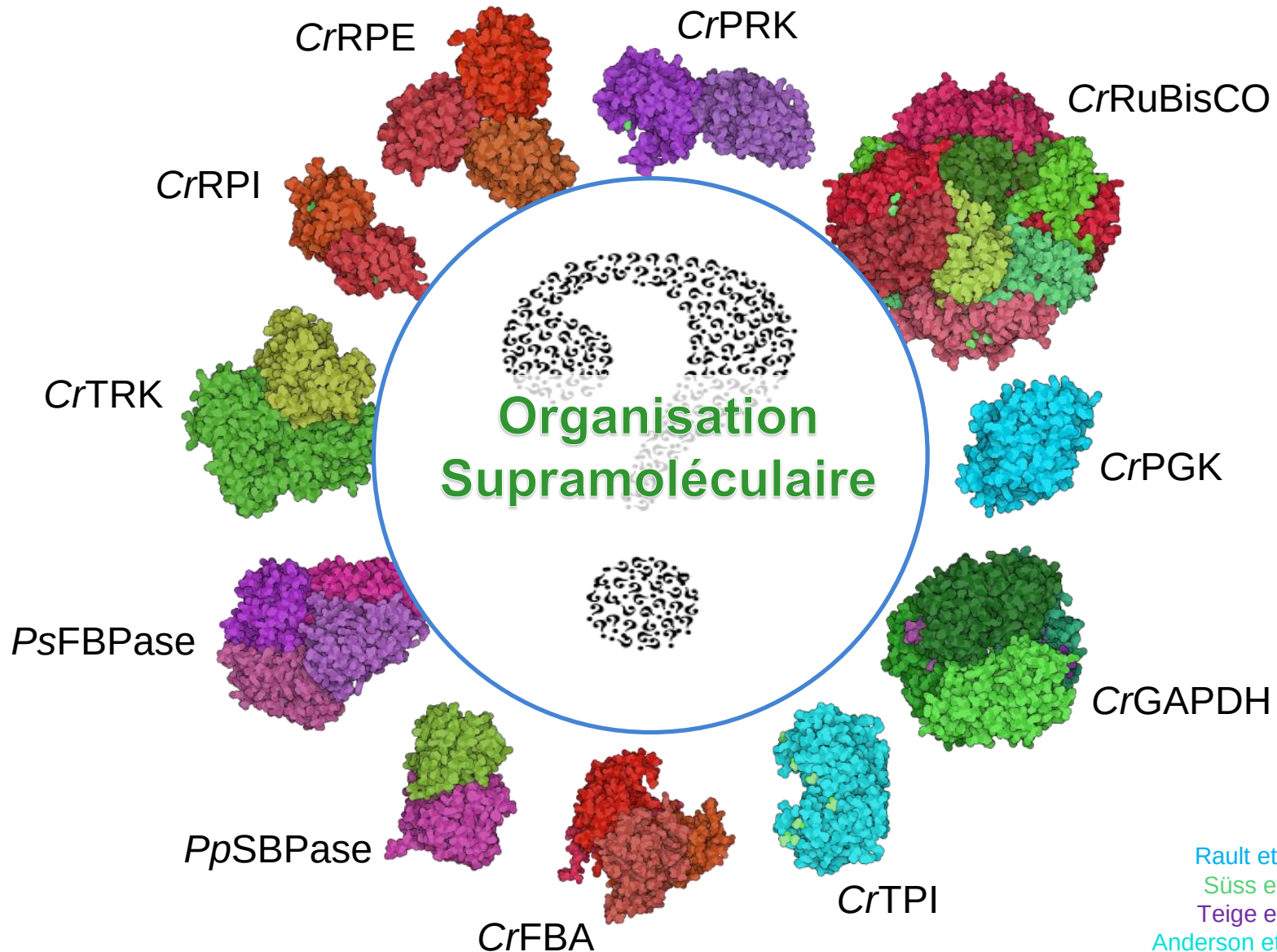
Süss et al PNAS 1993

Teige et al EurJB 1998

Anderson et al Planta 2005

Régulation multi-échelle du cycle de Calvin-Benson

Complexes multi-protéiques



Rault et al. EurJB 1993

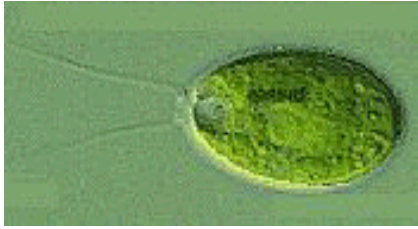
Süss et al PNAS 1993

Teige et al EurJB 1998

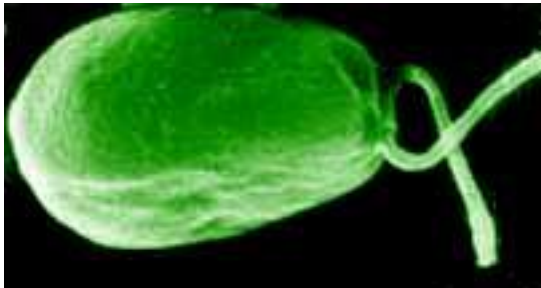
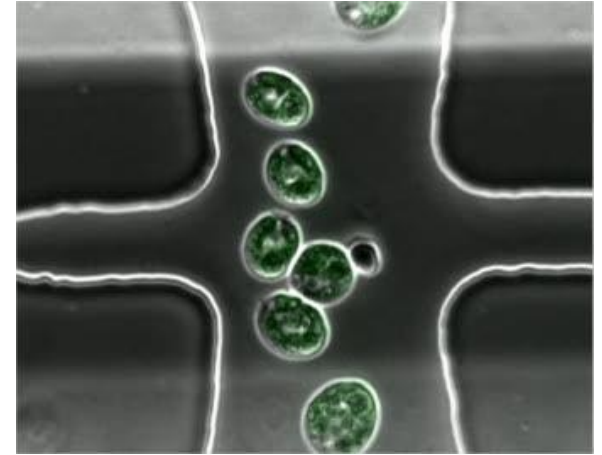
Anderson et al Planta 2005

Biologie Synthétique: un nouveau chassis

Chlamydomonas reinhardtii



- Algue verte eucaryote unicellulaire
- Appareil photosynthétique similaire aux plantes
- Photosynthèse facultative: croissance sur acétate
- Organisme haploïde: facilite la génétique
- Techniques de microbiologie standard, croissance rapide
- Trois génomes séquencés et annotés



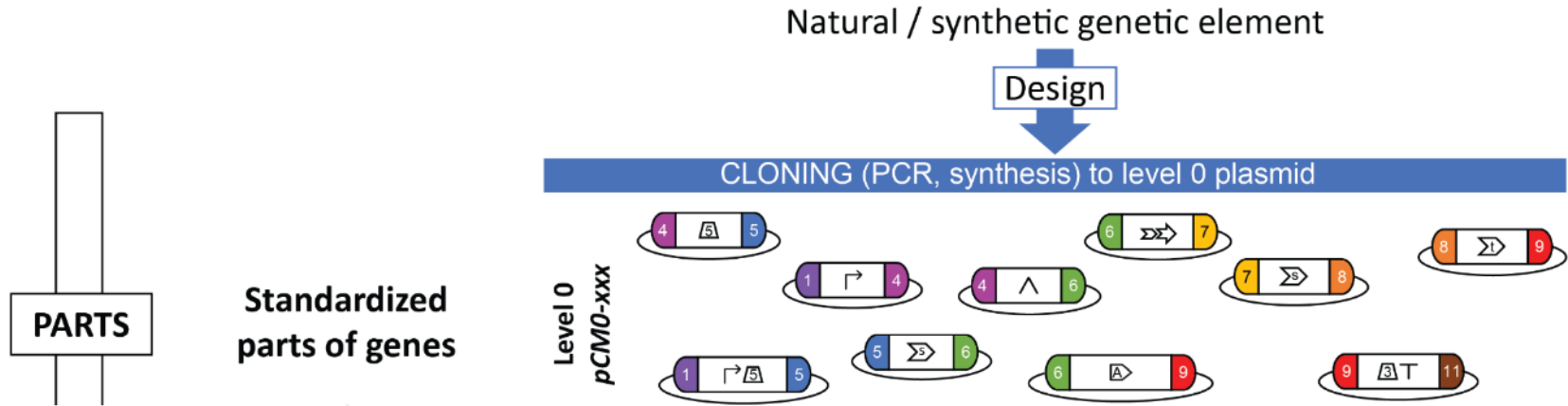
Outils de biologie moléculaire:

promoteurs, terminateurs, marqueurs de selection, rapporteurs...

RNA silencing, microARN artificiels, CRISPR/Cas9...

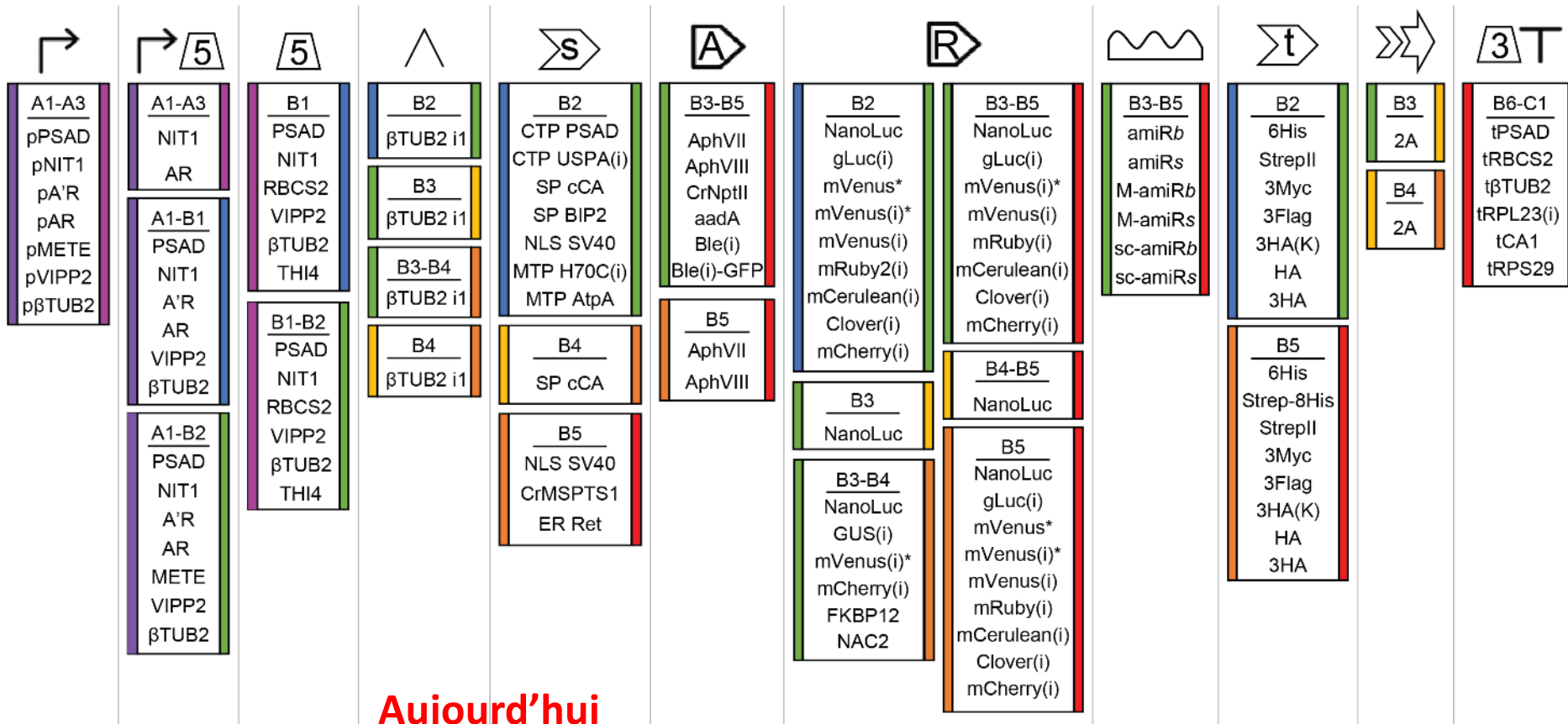
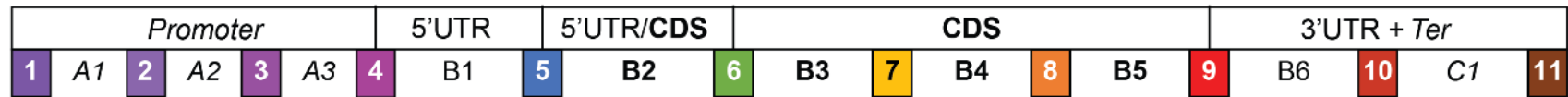
Il faut des outils standardisés pour construire

Assemblage standardisé Golden Gate = Modular Cloning (MoClo)



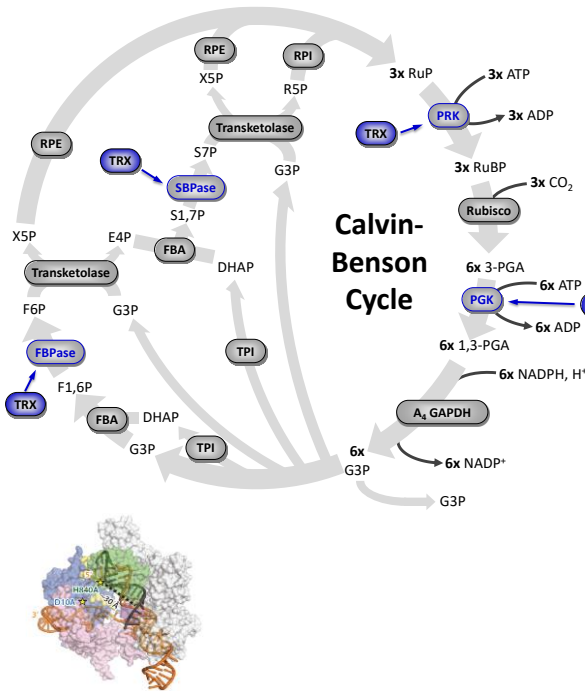
Un kit MoClo pour Chlamydomonas

120 briques pour une utilisation "Plug and Play"



Aujourd'hui
>350 briques

Biologie Synthétique de la fixation du Carbone



Calvin-Benson Cycle

re-design

de novo design

Moduler le CBC

Stœchiométrie

Rbc, SBPase...

Orthogonalité

Variants plus efficaces

Ingénierie des régulations

TRX, SSG, SNO, phosphorylation

- identifier, caractériser
- insensibilité *in vivo*

Remplacer le CBC

Cycles artificiels

- MOG (4-11 enzymes)
- CETCH (17 enzymes)
- Nouveaux designs

Paléobiochimie

- Ressusciter le CBC ancestral
- Evolution dirigée

Supramoléculaire

- De novo design
- Scaffolding, channeling

Outils de Biologie Synthétique

Biobriques

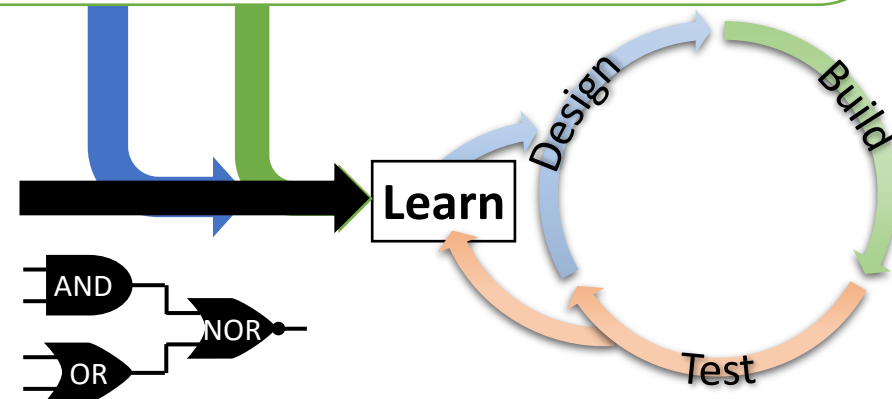
- Promoteurs synthétiques
- CRISPR/CAS
- Gènes suicide

Circuits génétiques

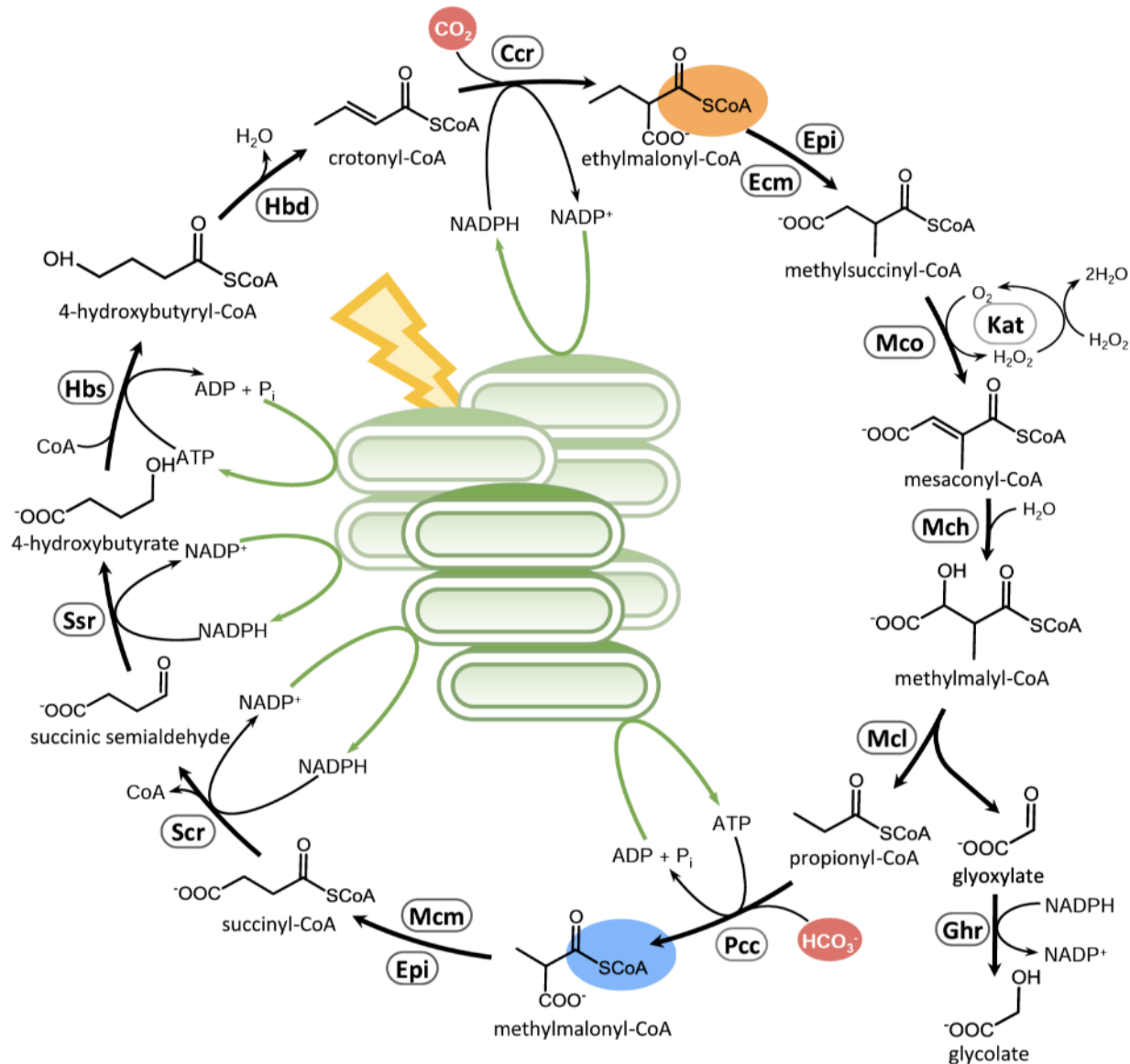
- Gates: AND, OR, NOR
- Encodage de mémoire
- Interrupteurs

Outils génomiques

- Chomosome artificiel
- Genome minimaux (Chloroplaste, Noyau)



CETCH Cycle, un cycle synthétique



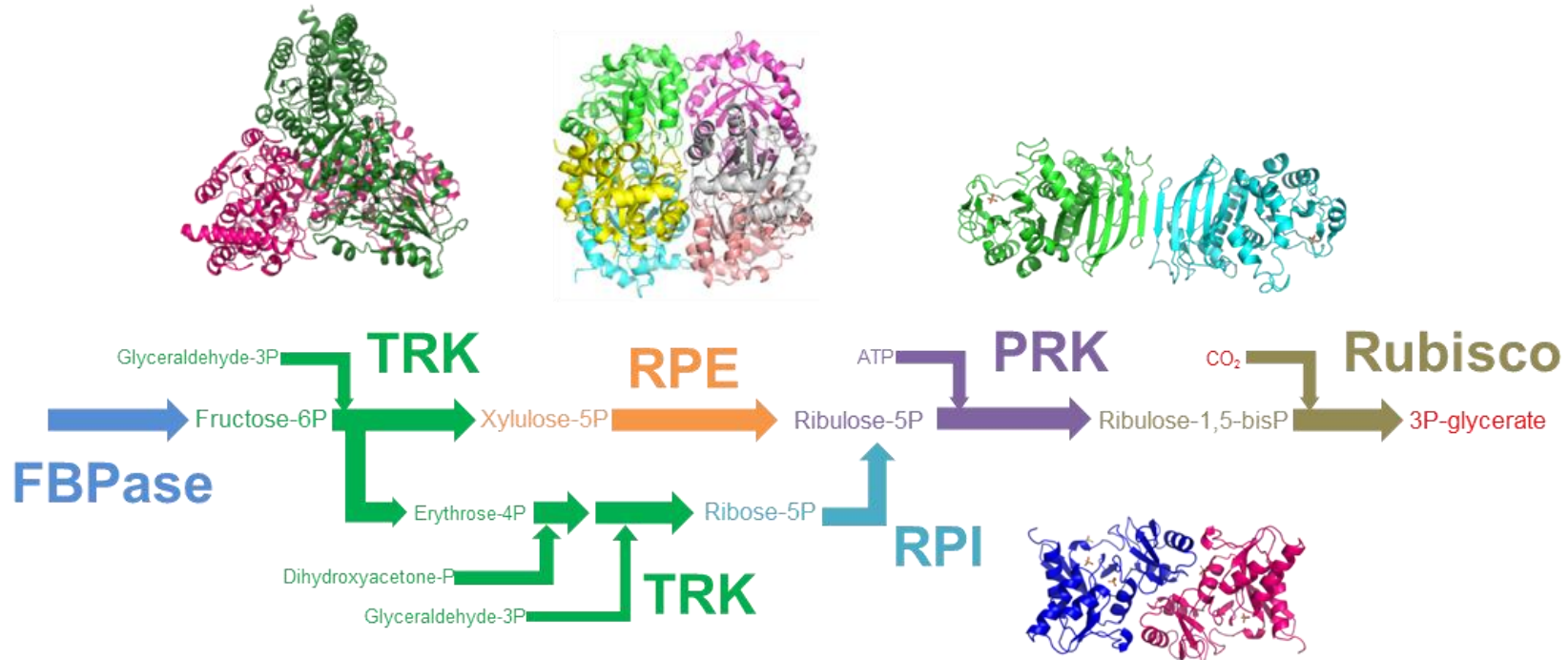
Le cycle de Calvin-Benson un assemblage métabolique intégré

Project Leader

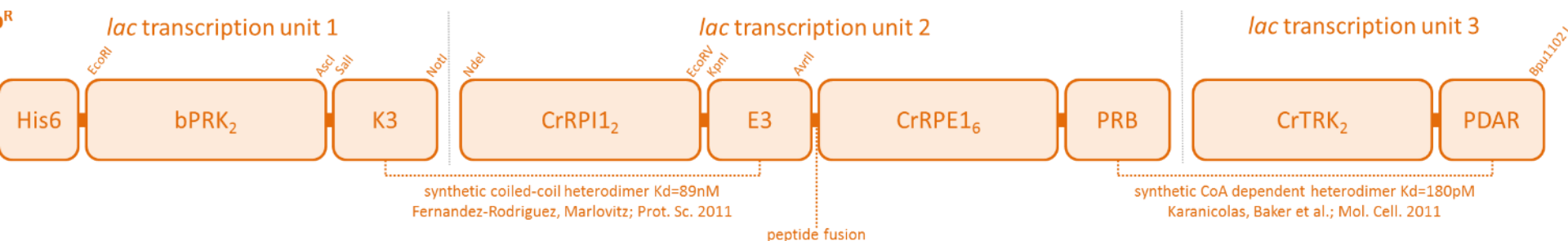


Julien
Henri
MCU SU

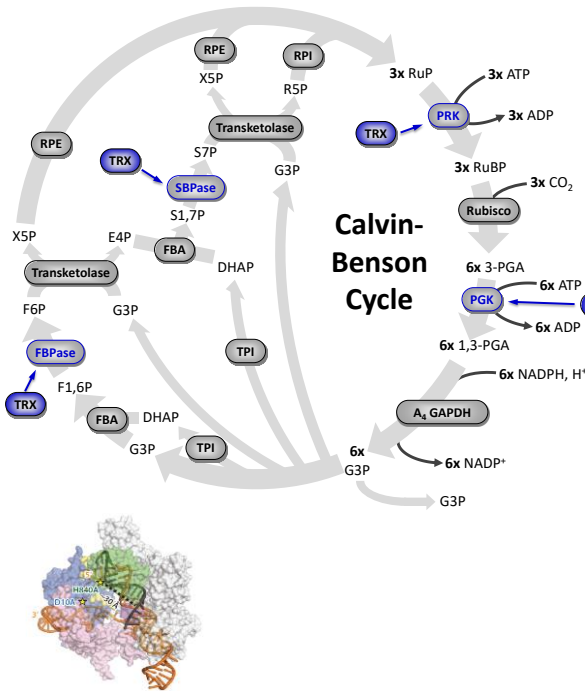
11 enzymes chloroplastiques, plusieurs complexes multi-enzymatiques, modulations allostérique, assemblages local non-membranaire, régulations post-traductionnelles



Conception d'assemblages protéiques artificiels à haute affinité, contrôlables et codés génétiquement



Biologie Synthétique de la fixation du Carbone



Calvin-Benson Cycle

re-design

de novo design

Moduler le CBC

Stœchiométrie

Rbc, SBPase...

Orthogonalité

Variants plus efficaces

Ingénierie des régulations

TRX, SSG, SNO, phosphorylation

- identifier, caractériser
- insensibilité *in vivo*

Remplacer le CBC

Cycles artificiels

- MOG (4-11 enzymes)
- CETCH (17 enzymes)
- Nouveaux designs

Paléobiochimie

- Ressusciter le CBC ancestral
- Evolution dirigée

Supramoléculaire

- De novo design
- Scaffolding, channeling

Outils de Biologie Synthétique

Biobriques

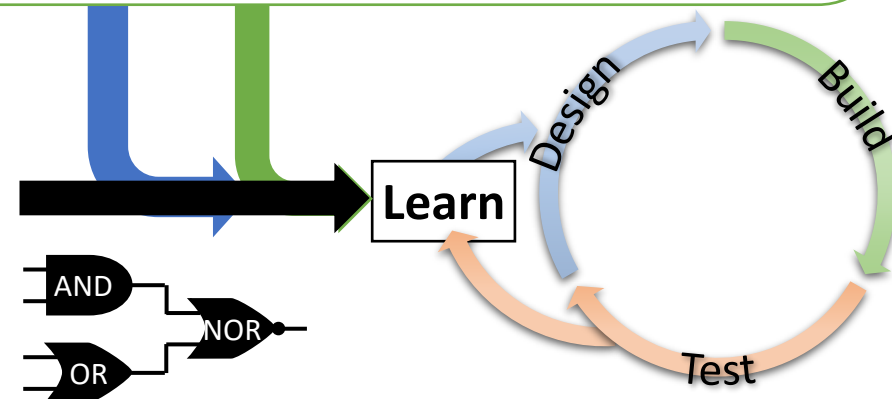
- Promoteurs synthétiques
- CRISPR/CAS
- Gènes suicide

Circuits génétiques

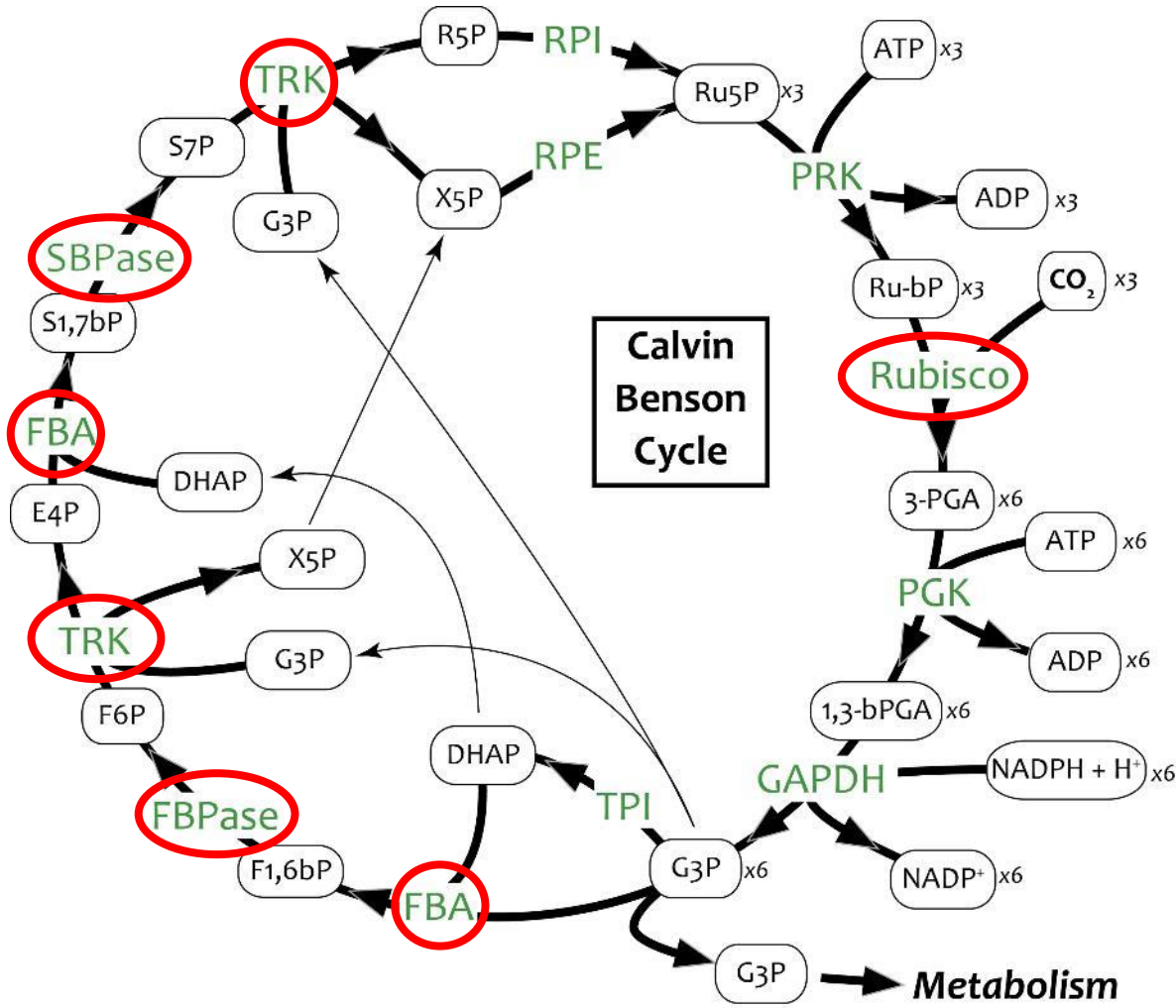
- Gates: AND, OR, NOR
- Encodage de mémoire
- Interrupteurs

Outils génomiques

- Chromosome artificiel
- Genome minimaux (Chloroplaste, Noyau)



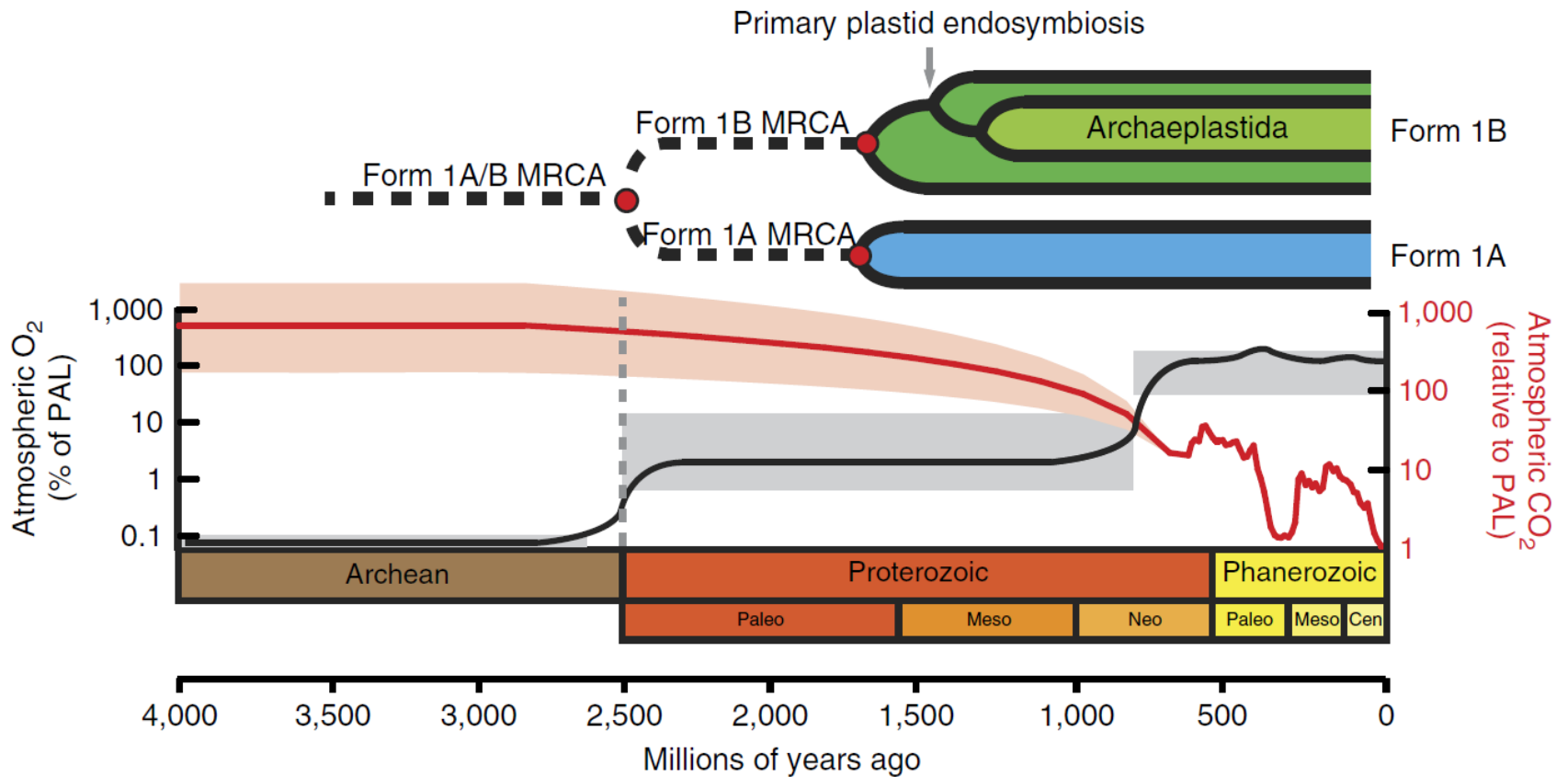
La photosynthèse est limitée par le cycle de Calvin-Benson



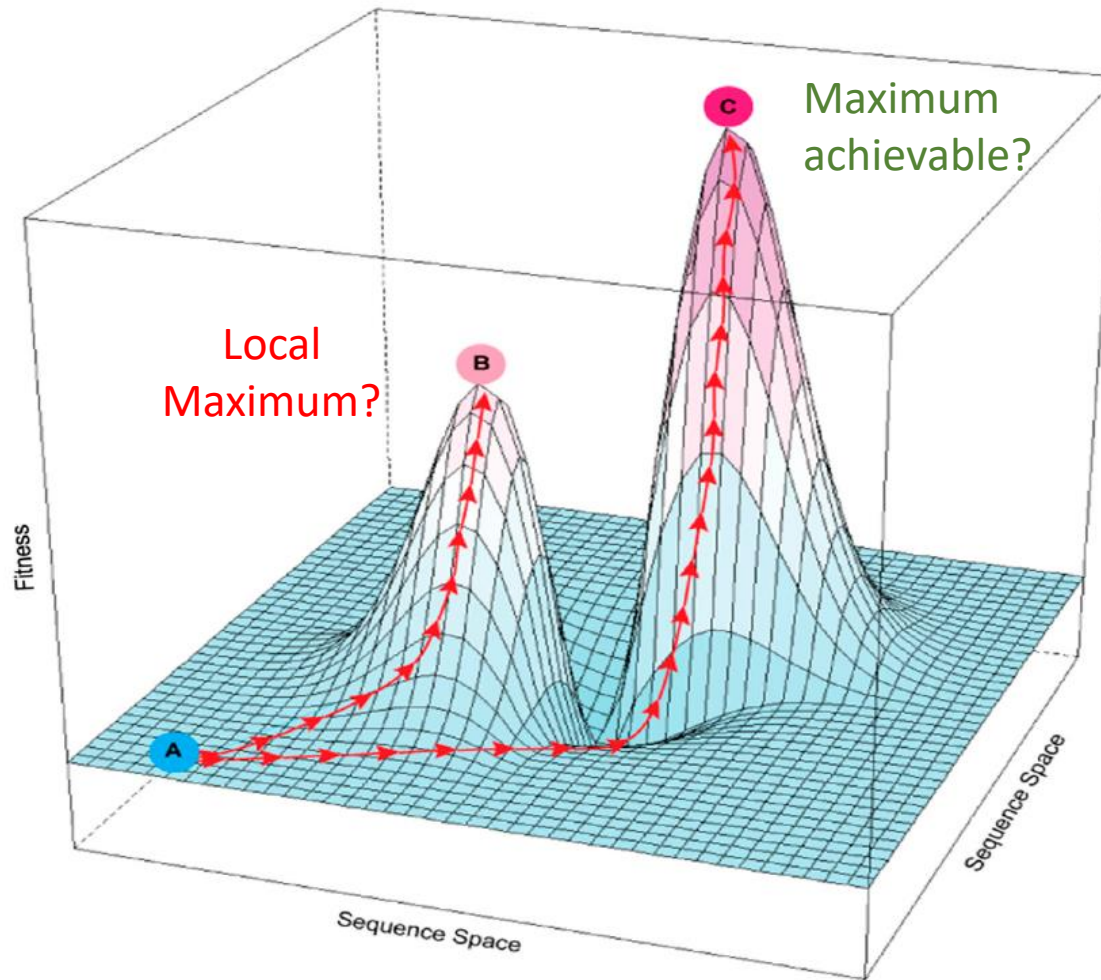
Pourquoi l'évolution n'a pas trouvé de meilleures enzymes ?

Parry et al., 2003, J Exp Bot
Durao et al., 2015, Nature Chem Biol
Hammel, et al. 2020, Front Plant Sci
Tamoi et al., 2006, Plant Cell Physiol
Simkin, et al., 2015, J Exp Bot

Le cas de la Rubisco

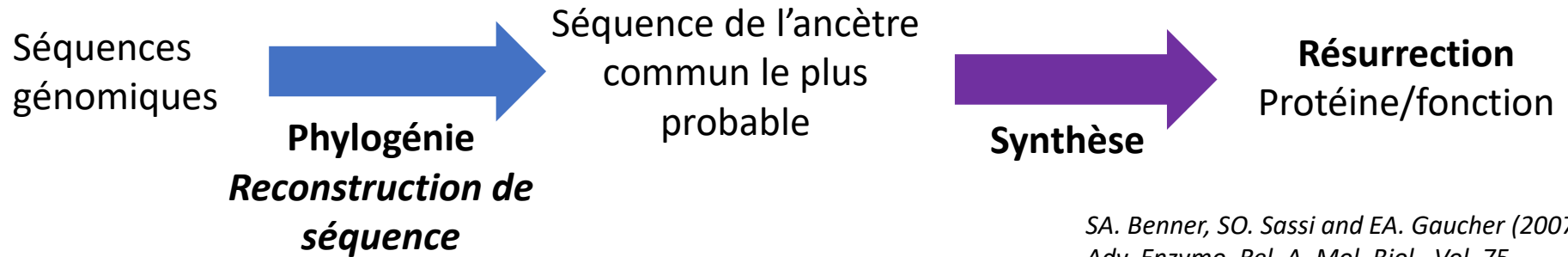


La vallée de fitness



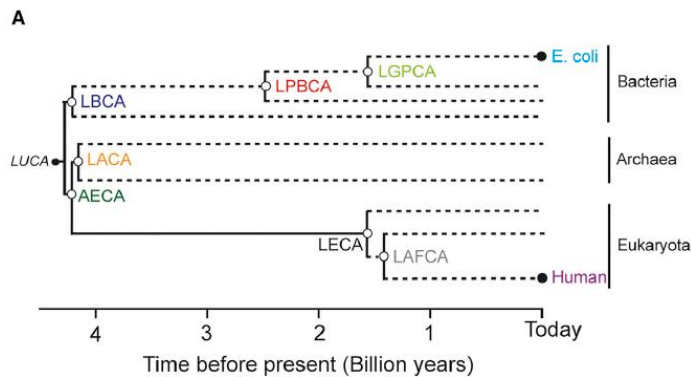
Comment tester cette hypothèse?

Paléosciences moléculaires

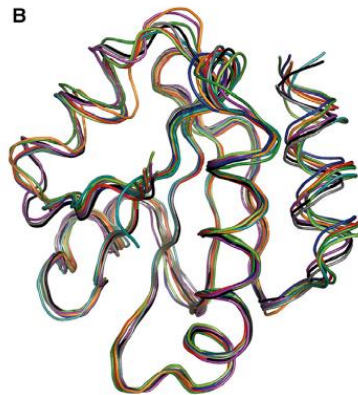


SA. Benner, SO. Sassi and EA. Gaucher (2007)
Adv. Enzymo. Rel. A. Mol. Biol., Vol. 75

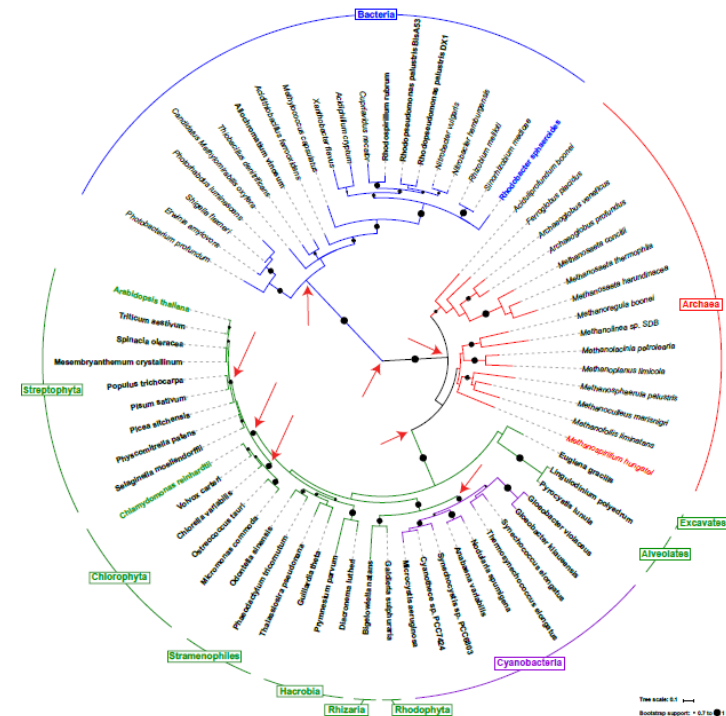
7 structures précambriennes de TRX



Ingles-Prieto et al. 2014 Structure



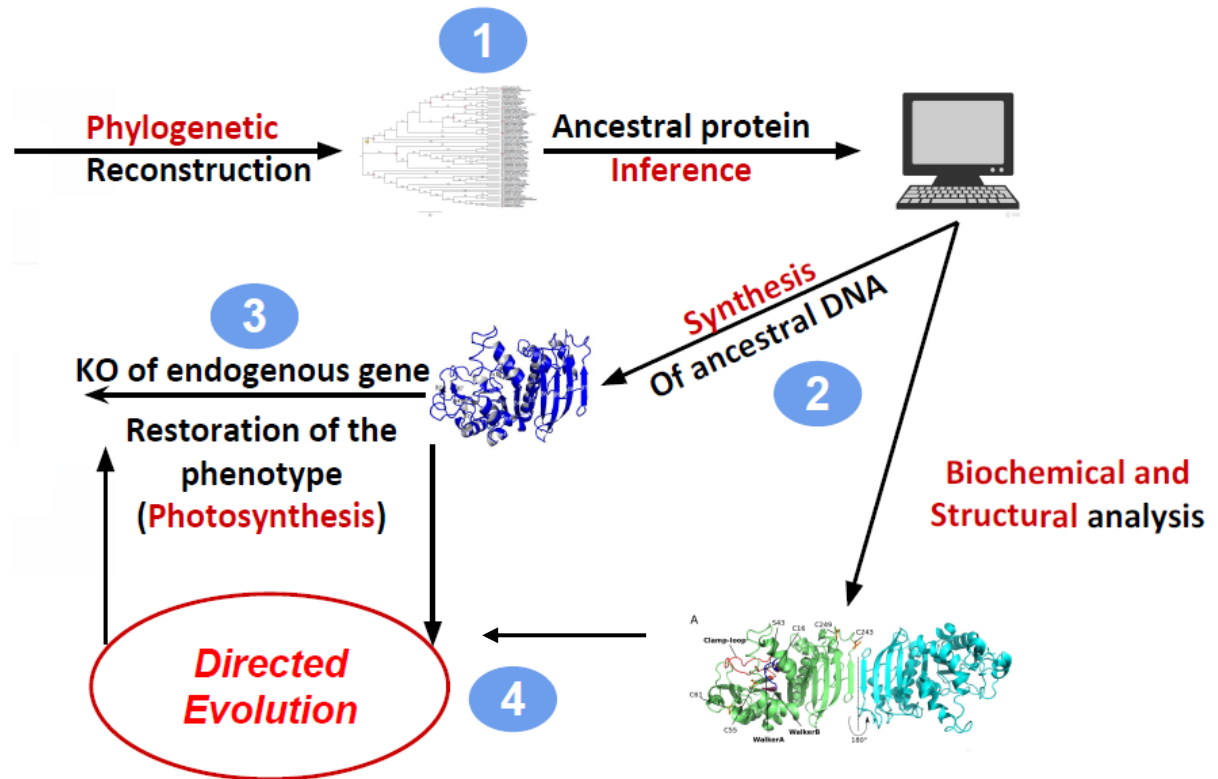
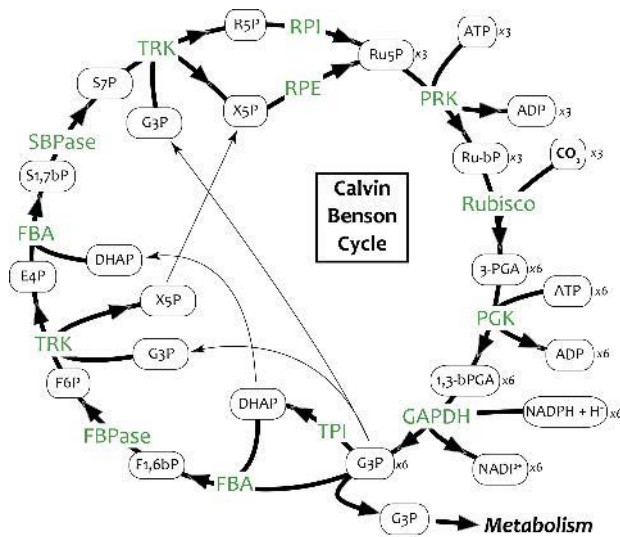
Rubisco ancestrales



Adapted from Gurrieri et al., 2019, PNAS



Le projet CalvinReboot





Laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative **CNRS/Sorbonne Université**

Stéphane Lemaire



Pierre Crozet, Assist. Prof. MCU SU
Julien Henri, Assist. Prof. MCU SU
Antoine Danon, Assist. Prof. MCU SU
Christophe Marchand, IR CNRS
Félix de Carpentier, Post-doc
Nicolas Cornille, IR, project engineer
Clémence Blachon, IE, project engineer
Giusi Favoino, IE project engineer
Mariette Gibier, IE project engineer
Achille Julienne, IE, project engineer
Nicolas Boisset, Ph. D. student
Théo Le Moigne, Ph. D. student

Marcello De Mia, Ph. D. & Postdoc
Esther Pérez-Pérez, Postdoc
Mirko Zaffagnini, Postdoc
Samuel Morisse, Ph. D. student
Mariette Bedhomme, Postdoc
Laure Michelet, Ph. D. & Postdoc
Xing-Huang Gao, Ph. D. student
Adeline Mauries, IE ANR
Marion Hamon, IE ANR
Jeanne Le Peillet, IE, project engineer
Alexandre Maes, IR, project engineer



Zhou Xu, LCQB, IBPS, Sorbonne Université
Bernd Amann, Stéphane Gançarski, LIP6, Sorbonne Université
Pierre Sens, LIP6, Sorbonne Université
Jean-Michel Camadro, IJM, Univ Paris
Gaëlle Lelandais, I2BC, Univ Paris-Saclay
Graham Noctor, IPS2, Univ Paris-Saclay
Corinne Cassier-Chauvat, CEA Saclay
Ariel Lindner, CRI, Univ Paris
Marc Baaden, IBPC, UPR9080, CNRS
Gilles Peltier, CEA Cadarache
Nicolas Rouhier, J.P. Jacquot, Univ Lorraine Nancy

William Zerges, Concordia University, Montreal, Canada
Paolo Trost, Mirko Zaffagnini, Francesca Sparla
Simona Fermani, Francesco Francia University of Bologna, Italy
José-Luis Crespo, University of Sevilla, Spain
Olaf Kruse, University of Bielefeld, Germany
Michael Schroda, Felix Willmund University of Kaiserslautern, Germany
Poul Erik Jensen, University of Copenhagen, Denmark
Alison Smith, David Baulcombe University of Cambridge, UK
Sergio Esposito, Univ Naples, Italy
Sabeeha Merchant, UC Berkeley, USA

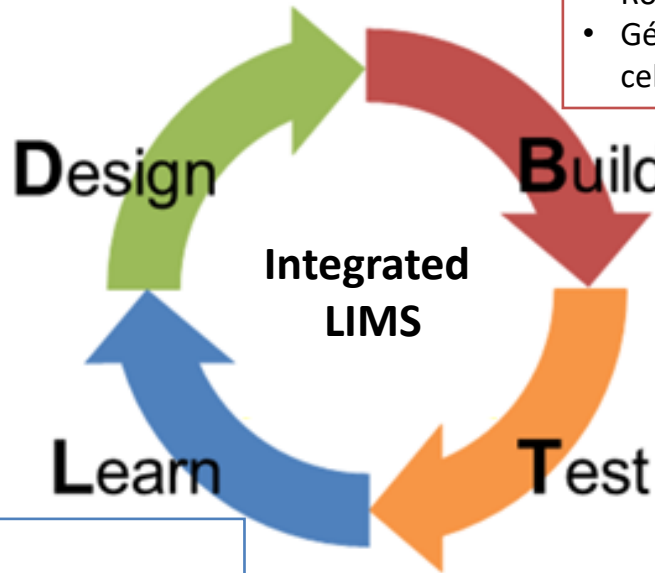
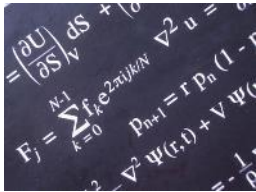
Extra Slides

La construction en biologie demain

BIOFONDERIE

Une structure dédiée aux cycles DBTL à haut débit

- Conception assistée par Ordinateur (CAD)
- Simulations



- Robots de manipulation de liquide (pipetage, acoustique)
- Robots de repiquage
- Génotypage automatisé (Transformation et culture des cellules, extractions d'ADN, analyse d'ADN...)

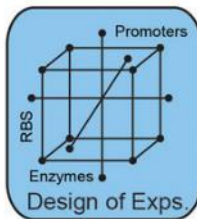
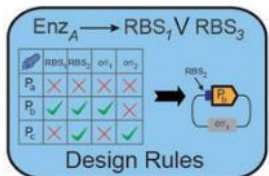


- Criblage et Phénotypage à haut débit
- Microfluidique, FACS, Imagerie Haut débit

- Analyses systémiques, (semi) automatisées
- RNAseq, séquençage de génomes (NGS)
 - Protéomique et Métabolomique ciblées ou non

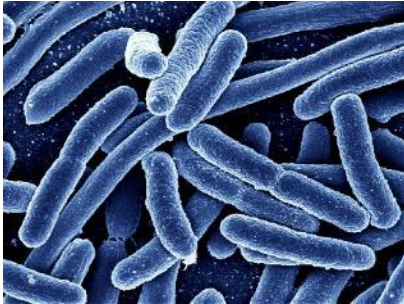


- Biologie des systèmes
- Mathématiques (modélisation, statistiques...)
- Machine learning, IA
- Fouille de données, Analyse visuelle



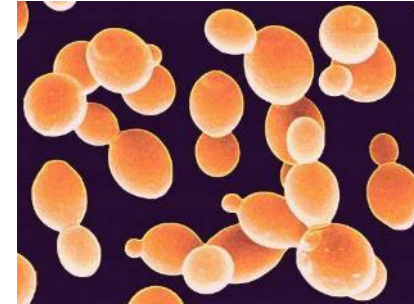
- Bactérie

Escherichia coli



- Levure

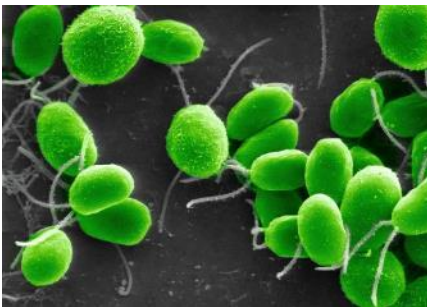
Saccharomyces cerevisiae



- Microalgues

microalgue verte

Chlamydomonas reinhardtii



cyanobactérie

Synechocystis sp PCC6803



- Autres chassis selon les projets

mammifères, cellules humaines, chassis de production industrielle

Objectifs



- **Cycles DBTL à haut débit**
 - ✓ Design et assemblage de chromosomes et de génomes.
 - ✓ Design et construction de circuits génétiques, d'enzymes
 - ✓ Ingénierie métabolique et conception de voies métaboliques artificielles pour le développement de souches à haute valeur ajoutée de bioproduction.
 - ✓ Maintien et le développement d'une banque de biobriques standardisées
 - ✓ Développement de procédés, de modèles prédictifs et de bases de données standardisées.
- Large ensemble d'**instruments robotisés**
- Pilotage par une **solution logicielle agile, open-source**, amplifiée par l'**intelligence artificielle**



1^{ère} biofonderie en France

1^{ère} biofonderie verte dans le monde