

# Apport de la biologie de synthèse en agriculture

*François Képès est biologiste cellulaire, membre de l'Académie des technologies et membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France. Il fut Professeur associé à l'École Polytechnique (France) et au Politehnica de Bucarest (Roumanie), Professeur invité au Collège Imperial de Londres (Royaume-Uni) et Directeur de recherches au CNRS.*

« Toute contrainte m'est grâce. »

(Leonard de Vinci)

## 1 Introduction

Alors même que nos paysans, éleveurs et cultivateurs, représentent une faible fraction des actifs du pays, la classique question de l'efficacité de notre agronomie est en passe de devenir centrale dans notre société. Les causes de cette évolution sont à trouver dans le défi démographique du xxi<sup>e</sup> siècle et l'augmentation tendancielle de la part protéique dans les régimes alimentaires, ainsi que dans l'impératif de léguer aux générations futures un monde viable. Comment à la fois réduire la faim et la pauvreté, améliorer la qualité

de vie dans le monde rural, favoriser un développement équitable, et durable aux plans économique, social et environnemental ? Il apparaît ainsi que l'agriculture et l'élevage doivent impérativement être insérés dans une problématique plus large qui inclut la circularité de notre économie. La bio-économie est au cœur de cette circularité car elle est fondée sur un substrat renouvelable, la biomasse, et englobe l'ensemble des activités liées à sa production, à son usage et à sa transformation. Une large part des productions de la bioéconomie peut être recyclée, et de là découle logiquement sa position privilégiée

dans cette circularité. La finalité de ces activités bioéconomiques est de répondre de façon durable aux besoins alimentaires et à une partie des besoins en matériaux et en énergie de la société. Les défis à relever incluent la sécurité alimentaire, le glissement climatique, la transition énergétique, et la diminution de l'impact environnemental des activités humaines. Certains de ces défis ne pourront être relevés en temps utile sans innovations, elles-mêmes appuyées sur des approches scientifiques et techniques nouvelles. En particulier, le domaine récent de la biologie de synthèse offre des concepts et outils qui sous-tendent une part croissante de la bioéconomie.

Ici, nous allons analyser les développements de la biologie de synthèse et les attentes qu'ils induisent pour accélérer les adaptations agronomiques *lato sensu*.

## 2 Définitions de la biologie de synthèse

Commençons par définir ce que la communauté scientifique concernée entend par biologie de synthèse. Ce domaine fondé en 2004 au Massachusetts Institute of Technology (MIT) est rapidement devenu lui-même un objet complexe d'étude. Opérationnellement, cette complexité implique que l'objet « biologie de synthèse » ne peut être cerné correctement sans une diversité d'angles de vue. Aussi apporterons-nous ici plusieurs éléments de définition qui, sans prétendre à l'exhaustivité, permettront du

moins de définir par petites touches successives ce qui est généralement entendu par biologie de synthèse.

La biologie de synthèse peut se définir brièvement comme l'ingénierie rationnelle de la biologie. Plus précisément, elle a été définie par le réseau de l'espace européen de recherche en biologie de synthèse (ERASynBio, 2014) comme le design délibéré et la construction de systèmes, basés sur ou inspirés par la biologie, pour mettre en place de nouvelles fonctions à des fins utiles, en s'appuyant sur des principes élucidés en biologie et en sciences de l'ingénieur. Cette définition « européenne » est compatible avec son homologue « américaine » que nous ne rappellerons pas ici.

### 2.1. Lien avec les biotechnologies

Un point de vue plus historique consisterait à voir la biologie de synthèse comme le fer de lance des biotechnologies avancées. Revenons brièvement sur ce que recouvrent les biotechnologies. Observons tout d'abord que la tradition les fait remonter à Noé qui, après le grand Déluge il y a environ 5 000 ans, planta une vigne, puis fermenta du jus de son raisin en vin. De même, on lui doit le premier accident biotechnologique puisque, ayant bu beaucoup de son jus de raisin fermenté, il se montra nu devant ses fils, selon la Bible. Sautons allègrement 5 000 ans pour rejoindre une vision moderne des biotechnologies. Dans sa leçon au Collège de France

en 2012, Paul Colonna a défini les biotechnologies comme l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à leurs composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de production de connaissances, de biens et de services.

Au début des années 2000, force était de reconnaître que les biotechnologies étaient loin de constituer une ingénierie mature, à rebours par exemple des ingénieries chimique, électronique, logicielle. Quelques mots-clés caractérisent la maturité d'une ingénierie : en particulier découplage entre la conception d'un objet et sa fabrication, hiérarchie de l'assemblage de composants en dispositifs, et de ces derniers en systèmes, normalisation et faculté de réutilisation des composants de base ou des dispositifs résultant de leurs assemblages, normalisation des méthodes d'assemblage de composants, modularité des dispositifs au sein du système complet. Les biologistes n'auront aucune difficulté à apprécier que ces mots-clés ne caractérisent pas encore les technologies du vivant. Cependant, la vitesse de maturation des biotechnologies a nettement crû depuis l'initiation volontariste de la biologie de synthèse en 2004, et leurs progrès méthodologiques récents sont étonnants. Comme c'est souvent le cas dans les activités humaines, le choix de diriger des efforts importants vers cette maturation de l'ingénierie biologique transforme ce qui fut une lente

progression par marche aléatoire en une démarche ciblée et assumée qui enregistre une série de petits succès alimentant le fleuve des avancées collectives.

## 2.2. Ambitions

Une part de l'ambition de la biologie de synthèse est utilitaire : il s'agit de réduire les délais et les coûts d'obtention de composés utiles tels que médicament, vaccin, capteur, matériau ou carburant. Au plan des applications, 116 procédés industriels ou produits issus de la biologie de synthèse ont été comptabilisés, qui en 2015 étaient sur le marché ou tout proche (Woodrow Wilson Center, 2015). Cet inventaire n'est même plus envisageable en 2021 car l'inventivité qui est l'une des caractéristiques de ce domaine a entraîné une explosion de ses champs d'application. Parmi ces derniers, citons à titre illustratif le plus récent, l'approche qui consiste à archiver les mégadonnées numériques sur l'ADN (Académie des technologies, 2020). Si l'accent mis sur l'ingénierie la positionne sur le versant appliqué de la recherche, la biologie de synthèse occupe en fait tout le spectre depuis le versant fondamental. En effet, modéliser et construire un système biologique qui se comporte comme prévu est une bonne manière de s'assurer que l'on a compris comment fonctionnent les phénomènes biologiques sous-jacents, donc de faire progresser les connaissances fondamentales. Par exemple, nous savons que le code génétique – qui fait correspondre à un acide aminé un

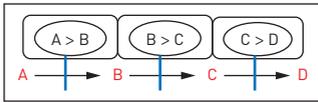
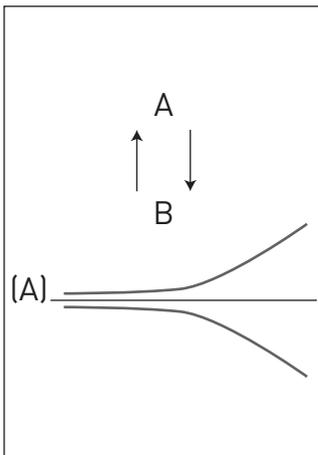


Figure 1

**Circuit métabolique.** La transformation de la petite molécule A en petite molécule D se fait en 3 étapes dans cet exemple simulé. Chaque étape est accélérée par un catalyseur, note  $A > B$  etc. Dans un bioprocédé, ces catalyseurs sont presque toujours des protéines appelées enzymes. Les flèches rappellent que dans une cellule vivante, les réactions chimiques sont souvent orientées par leur thermodynamique.



triplet de nucléotides dans l'ARN messager qui le code – est quasi-universel. Est-ce en raison de contraintes physicochimiques (affinité chimique particulière entre tel acide aminé et tel triplet de nucléotides qui le code), ou en raison d'un accident évolutif gelé (tous les organismes actuels dérivent du même ancêtre qui par hasard usait de ce code génétique dont ils ont donc hérité) ? Le meilleur chemin pour discriminer entre ces deux hypothèses est du ressort de la biologie de synthèse, et consiste à modifier ponctuellement le code génétique dans une cellule et à observer si cette dernière reste viable. Entre parenthèses, la réponse est que la cellule dont le code génétique a été altéré est viable, ce qui démontre qu'aujourd'hui les contraintes physicochimiques ne jouent pas de rôle, mais ce qui n'exclut pas qu'elles aient joué un rôle durant la genèse de ce code génétique ; en tout cas, l'hypothèse d'un ancêtre commun à tous les êtres vivants actuels en sort renforcée.

### 2.3. Contenu

L'axe historiquement majeur de la biologie de synthèse consiste à concevoir rationnellement et à construire des circuits biochimiques modulaires à partir de composants standardisés et interchangeables (Csorgo *et al.*, 2012 ; Dymond *et al.*, 2011 ; Esvelt & Wang, 2013 ; Gibson *et al.*, 2010 ; Luisi, 2006). Ces circuits peuvent être métaboliques ou régulateurs, ou encore mêler ces deux types. Un circuit métabolique permet d'effectuer une suite de réactions biochimiques (Figure 1) débutant avec un composé naturel ou bon marché, et s'achevant avec le produit souhaité, un parfum ou un colorant par exemple. Un circuit régulateur permet de déclencher cette production au moment opportun, de la réguler et d'améliorer son efficacité. Il permet aussi de déclencher un circuit à un moment précis, par exemple en mesurant le temps par un oscillateur périodique, puis en déclenchant un interrupteur. Le premier interrupteur biologique artificiel (Gardner *et al.*, 2000) est présenté en Figure 2. Enfin,

Figure 2

**Circuit régulateur exemple d'un interrupteur biologique artificiel.** A et B sont deux protéines régulatrices. Selon le schéma de principe donné en haut, chacune inhibe la production de l'autre. Intuitivement, on voit que plus il y a de A, moins se fera de B, donc plus se fera de A. En bref, plus il y a de A, plus il y a de A. Idem pour B par raison de symétrie. Au sens de René Thomas (Thomas & D'Ari, 1990), il s'agit donc d'un circuit de rétroaction de type positif. Son comportement (cinétique de la concentration de A montrée en bas) est donc que l'interrupteur sera, soit en position A en haut et B en bas, soit l'inverse. La position de l'interrupteur dépend des paramètres du circuit, mais aussi des conditions initiales, selon lesquelles la concentration de A est fixée au départ au-dessus, ou en-dessous, d'un seuil critique symbolisé ici par une ligne horizontale. En tous cas, en l'absence d'une intervention extérieure, l'interrupteur reste à la position où il se trouve. C'est donc bien un interrupteur bistable. Ce circuit régulateur artificiel a été conçu, puis construit dans une bactérie (Gardner *et al.*, 2000).

notons que ces circuits biochimiques peuvent être assemblés au sein de particules (*in vitro*) ou de cellules vivantes (*in vivo*).

Tous ces éléments de nouveauté dans le champ de la biologie et de la biotechnologie fondent et justifient la forte transdisciplinarité de la biologie de synthèse, qui s'appuie ainsi sur la biologie, la physique, la chimie, les mathématiques, l'informatique, l'automatique, irrigués par les sciences de l'ingénieur (Figure 3). Des informations supplémentaires francophones sur la biologie de synthèse peuvent être trouvées dans des publications destinées à tout public (Képès, 2011 ; 2013 ; 2014 ; 2017).

Comment ce domaine scientifique multi-facettes récemment émergé qu'est la biologie de synthèse pourrait-il accélérer les améliorations agronomiques *lato sensu* ?

### 3 Bioproduction et énergie

La biomasse est la matière d'origine biologique basée principalement sur des atomes de carbone, oxygène, azote et hydrogène. Il est important de remarquer d'emblée que la biomasse provenant de l'agriculture et de la forêt est par sa quantité la plus importante ressource à laquelle ait accès l'industrie humaine. C'est au total la quatrième source d'énergie mondiale après le pétrole, le charbon et le gaz, mais la première si l'on ne prend en compte que les ressources renouvelables. Elle représente un total d'environ 100 milliards de tonnes de carbone par an, dont seule une

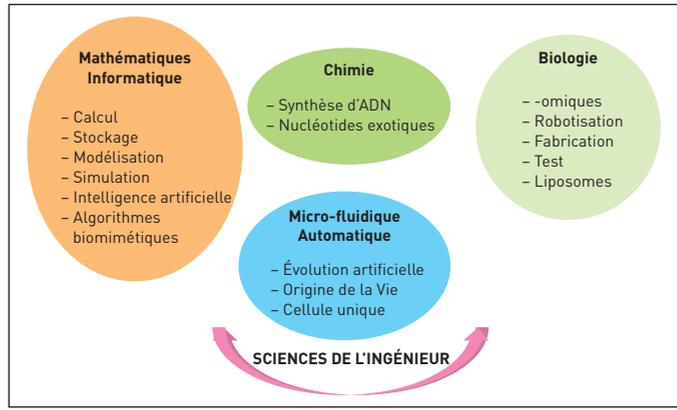


Figure 3

#### Moteurs scientifiques du développement de la biologie de synthèse.

Par essence, la biologie de synthèse est un domaine fortement transdisciplinaire. Selon les projets, elle fera appel à des degrés divers aux disciplines de la biologie, la chimie, la physique, la mathématique, l'informatique, l'automatique. Elle est intrinsèquement irriguée par les sciences de l'ingénieur.

fraction est disponible pour l'industrie. La plus grande part de cette masse est représentée par le bois, dont hélas la structure lignocellulosique est encore aujourd'hui assez faiblement exploitable (Morot- Gaudry & Pernollet, 2013). La biomasse possède les avantages d'une couverture mondiale bien répartie et d'une grande versatilité d'usage. Discutons cette versatilité dans le contexte de notre sujet, en distinguant l'usage de la biomasse pour produire de l'énergie, et pour fabriquer des composés chimiques utiles aux activités humaines.

#### 3.1. Production d'énergie

Parmi les usages possibles de la biomasse, la production d'énergie est souvent montée en épingle. Avec 6 % de la biomasse annuelle globale, il serait possible de couvrir 50 % de la demande énergétique primaire mondiale (SLU, 2009). Elle a aussi ses détracteurs, comme Harmut Michel, expert de la photosynthèse et

prix Nobel, pour qui la production de biocarburants constitue un très inefficace usage de la terre agricole si l'on prend en compte l'ensemble du cycle productif, y compris les ressources fossiles consommées pour extraire et transporter les engrais, travailler la terre, etc. (Michel, 2012). Cependant, au-delà des méthodes traditionnelles (brûlage par exemple), des approches plus récentes se sont fait jour pour mieux recycler la liqueur noire qui est le résidu toxique des papeteries, et pour mieux exploiter les biocarburants de première et seconde générations. La première génération de biocarburants à sa source dans l'amidon ou le sucre de canne, alors que la seconde la trouve dans les déchets domestiques, agricoles et forestiers, et donc n'entre pas en compétition avec la production de nourriture.

En outre, la biomasse, notamment sa part de sucres complexes (cellulose), peut être convertie en sucres simples (xylose, arabinose, glucose) servant de source de carbone pour la croissance de micro-organismes, lesquels peuvent produire des composés utiles de manière plus flexible et diversifiée que les plantes elles-mêmes ne pourraient le faire directement. Examinons d'abord les voies de bioproduction directement par les plantes, puis indirectement par les micro-organismes alimentés par de la biomasse généralement issue de plantes.

### 3.2. Bioproduction par les plantes

Les plantes ou algues cultivées peuvent être utilisées

directement pour produire un composé utile. Ceci exige que la plante ou l'algue soit sélectionnée ou modifiée génétiquement pour, soit surproduire ce composé naturel, soit produire ce composé qu'elle ne synthétise pas naturellement. Dans le premier cas – surproduction, des modifications différentielles des régulations des gènes impliqués dans la voie métabolique conduisant au composé d'intérêt peuvent suffire. Parfois même, l'inactivation d'un ou quelques gènes impliqués va aboutir au résultat souhaité. Le cas le plus simple est celui dans lequel le gène codant l'enzyme qui consomme le composé recherché est inactif, ce qui résulte en l'accumulation de ce composé ; le succès demande alors que les petites molécules en aval de ce barrage artificiel ne soient pas indispensables à la survie des cellules modifiées, ou que des mesures compensatrices soient adoptées pour fournir les éléments indispensables. Dans le second cas – néoproduction, outre d'éventuelles modifications régulatrices, il est généralement nécessaire de transplanter par transgénèse depuis un autre organisme la voie métabolique requise pour la production du composé recherché. En pratique, cela requiert d'ajouter quelques gènes codants ladite voie métabolique au patrimoine génétique de la plante ou de l'algue. Il est généralement nécessaire d'adapter ces gènes étrangers à leur nouvel hôte, que ce soit par l'usage des codons synonymes, ou par la mise en place en amont de ces gènes de séquences régulatrices qui fonctionnent dans

cette plante. Un exemple en est la bioproduction par des plantes de la soie de l'araignée dont les propriétés mécaniques sont extraordinaires, mais qui ne peut être obtenue en quantité suffisante depuis l'araignée, contrairement à la soie depuis son ver (Hauptmann *et al.*, 2013 ; Scheller *et al.*, 2001).

### 3.3. Bioproduction par les micro-organismes

Plutôt que de faire produire à des plantes le composé d'intérêt, une alternative consiste à obtenir depuis la biomasse une source de carbone qui alimente convenablement des micro-organismes modifiés génétiquement pour produire ce composé dans des fermenteurs. En effet, les micro-organismes du type bactéries ou levures sont plus aisément et plus rapidement manipulables pour un objectif de bioproduction. Ils sont souvent capables de pousser dans un milieu de culture constitué exclusivement d'eau, de sels et d'une source de carbone. Cette

dernière étant en pareil cas le constituant le plus coûteux du milieu de culture, le prix de revient du composé d'intérêt dépend partiellement de celui de cette source de carbone, qui doit donc être abondante, bon marché, et produite localement afin d'abaisser les coûts de transport. Plus loin sera discutée la possibilité d'utiliser du CO<sub>2</sub> comme source gratuite et abondante de carbone.

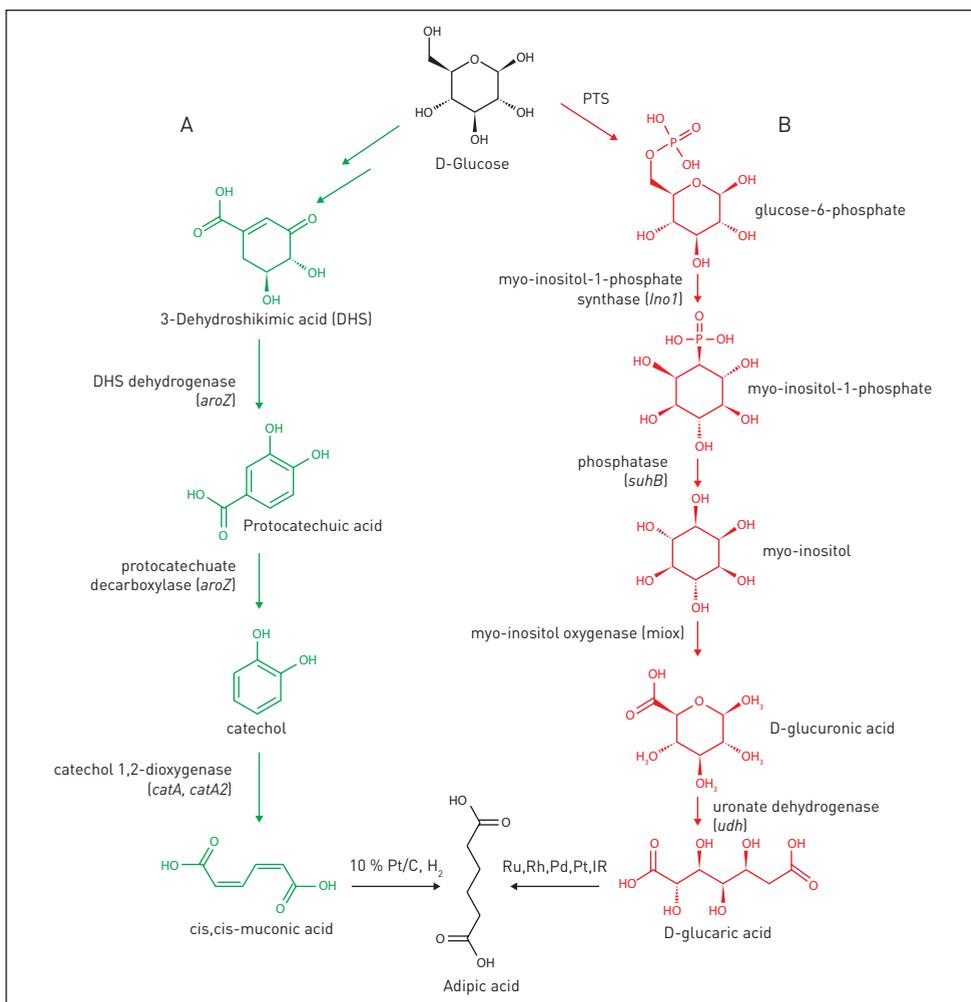
De ces considérations dérive l'intérêt d'utiliser des sucres obtenus par hydrolyse de la cellulose constituant une part de la biomasse, en provenance de déchets domestiques, alimentaires, forestiers, ou agricoles. Cependant, certains projets envisagent également d'utiliser des dérivés aromatiques issus de la dégradation de la lignocellulose - et non pas seulement de sa fraction cellulosique - dont il a été rappelé plus haut qu'elle constitue la majorité de la biomasse globale. L'exemple de l'**Encadré 1** permet, pour le même composé cible, de discuter de ces deux possibilités, soit sucre, soit dérivé aromatique.

#### ENCADRÉ 1

##### Synthèse du nylon

L'acide adipique (ou acide hexanedioïque), de masse moléculaire  $146 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , est l'un des acides dicarboxyliques aliphatiques les plus importants au plan commercial, utilisé principalement pour la manufacture du nylon 6-6. Actuellement, 2,85 millions de tonnes d'adipate sont produites annuellement à partir de ressources fossiles. Malheureusement, ce procédé crée des gaz à effet de serre et des sous-produits toxiques qui ont le potentiel de gravement polluer l'environnement (Dickinson & Cicerone, 1986 ; Thiemens & Long, 2017 ; O'Connor *et al.*, 1999). Aussi, depuis 1994, plusieurs tentatives ont été menées pour mettre au point une méthode de manufacture de l'adipate par voie biologique. À ce jour, les méthodes de biosynthèse les plus efficaces approchent de la viabilité économique, qui reste évidemment le critère pragmatique du succès. Parmi ces méthodes, nous analyserons brièvement deux approches prenant pour substrat, soit un sucre, soit un dérivé aromatique, et aboutissant

au précurseur immédiat de l'adipate, l'acide cis, cis-muconique. Une seule étape chimique suffit ensuite pour mener à l'adipate proprement dit. La biosynthèse d'acide muconique peut emprunter deux voies. Premièrement, il peut être synthétisé à partir d'un sucre simple, le glucose, en introduisant une voie métabolique synthétique dans la bactérie *Escherichia coli*. Ce fut la première tentative de bioproduction d'acide muconique, en 1994, ensuite améliorée en 2002 (Niu *et al.*, 2002 ; **Figure 4**). Cependant, cette bactérie est sensible aux effets toxiques des acides organiques comme l'acide muconique. D'autres tentatives de bioproduction ont fait appel à diverses levures, naturellement plus tolérantes aux acides organiques. Cependant, les titres obtenus en acide muconique ont été faibles, en partie car les levures étaient sensibles à l'inhibition par les aminoacides aromatiques produits par la voie métabolique modifiée (Curran *et al.*, 2013). Deuxièmement, l'acide muconique peut être produit directement à partir de composés aromatiques dérivés de la lignine, notamment chez des bactéries dotées de propriétés naturelles adaptées à cette tâche. Pour l'instant, le verrou à lever dans cette voie est en fait la dépolymérisation de la lignine, déchet forestier majeur, qui assurerait une biosource au procédé (Deng *et al.*, 2016).



**Figure 4**

**Deux voies biologiques principales de synthèse d'acide adipique à partir de D-glucose.** Dans les deux cas, une seule étape chimique permet de passer du précurseur à l'acide adipique [en bas] (A) via l'acide cis, cis-muconique. (B) via l'acide D-glucarique (adapté depuis Deng *et al.*, 2016).

### 3.4. Défis ordinaires dans le domaine de la bioproduction

Le problème majeur de toutes ces approches, dans les plantes, algues, levures ou bactéries, est l'existence de goulots d'étranglement le long de la voie métabolique (**Figure 1**) menant au produit désiré, ce qui entraîne en amont l'accumulation de composés intermédiaires. Ceci réduit le rendement en produit final. En outre, bien souvent l'intermédiaire s'accumulant, ou le produit final, est toxique pour les cellules, dont le taux de croissance et le rendement baissent alors drastiquement. Une des étapes les plus consommatrices en temps et en financement dans les projets de bioproduction consiste à éliminer ces goulots d'étranglement. Cette élimination se faisait traditionnellement par essai et erreur. La biologie de synthèse a rationalisé (partiellement à ce stade) ce long et coûteux processus.

## 4 Agronomie et biologie de synthèse

Les biotechnologies et l'agronomie entretiennent de nombreuses et riches relations. Notre propos est ici plus étroit et embrasse préférentiellement les apports de la biologie de synthèse. Nous examinerons un cas dans le monde animal, et plusieurs pistes de travail dans le monde végétal qui fait l'objet d'une profusion d'initiatives.

### 4.1. Monde animal

Commençons par un exemple récent dans le monde

animal. Les greffes d'organe se heurtent au trop faible nombre de dons. Une ligne de recherche consiste à utiliser les organes de porc qui ont des tailles compatibles avec ceux de l'humain. Pour la sécurité du patient, il faut enlever les séquences d'anciens (retro-) virus intégrés dans le génome porcine car ils sont susceptibles de se réactiver chez l'humain. L'équipe de G.M. Church aux États-Unis d'Amérique a enlevé par multiplexage les 62 sites concernés et publie ces résultats dans un seul article (Niu *et al.*, 2017). Trois ans plus tôt, on aurait pu imaginer qu'il y faille de nombreuses équipes travaillant en parallèle durant 1-3 ans pour chacune enlever un ou quelques sites, avec au total la publication d'une soixantaine d'articles. Notons au passage que ces travaux ont motivé la création d'une société biotechnologique susceptible de valoriser leurs acquis. En bref, l'approche utilisée dans ces travaux fait usage des nouvelles méthodes de multiplexage en génie génétique, c'est-à-dire des techniques permettant d'effectuer simultanément plusieurs modifications ciblées de génomes, éventuellement avec des ciseaux moléculaires efficaces du type CRISPR-Cas9, environ 10 fois plus rapides et moins chers que les approches précédentes (Jinek *et al.*, 2012 ; Doudna & Charpentier, 2014).

S'il est vrai que les modifications de ce porc sont motivées par les transplantations d'organes en santé humaine (Lu *et al.*, 2020), il n'en reste pas moins que les méthodes utilisées et l'ampleur des

changements réalisés ouvrent grande la porte à des modifications génétiques complexes portant sur de très nombreuses espèces animales d'élevage. Maintenant que les technologies sont disponibles et accessibles, les objectifs de telles modifications rationnelles concernent potentiellement tous les traits pertinents chez les animaux de rente (Thompson *et al.*, 2018 ; Jabbar *et al.*, 2021).

#### 4.2. Monde végétal

De nombreuses modifications pourraient en principe être apportées aux plantes dans le but d'améliorer leur photosynthèse et croissance, de recourir à moins de produits phytosanitaires, ou d'altérer leur composition pour faciliter

leur usage. Nous distinguons ci-dessous sept approches distinctes pour clarifier notre propos, même s'il y a des recouvrements entre elles.

#### Photosynthèse

D'abord un rappel (**Figure 5**). Au sens large, la photosynthèse comporte deux phases, une phase lumineuse et une phase « métabolique » indépendante de la lumière. La phase lumineuse fait appel à des centres réactionnels incluant des pigments comme la chlorophylle ; elle transforme l'énergie lumineuse en énergie biochimique, et recycle des cofacteurs biochimiques pour qu'ils reviennent à leur forme adéquate en vue de la phase métabolique qui suit. C'est cette phase métabolique qui permet d'aboutir aux sucres par des cycles chimiques au premier rang desquels le cycle de Calvin. Rappelons que, chaque année, plus de 350 milliards de tonnes de  $\text{CO}_2$  atmosphérique sont fixées grâce à un processus appelé « fixation autotrophique de  $\text{CO}_2$  ». Plus de 90 % sont en fait fixés par un cycle de réactions biochimiques appelé « cycle de Calvin » qui opère chez les plantes, les algues et certains micro-organismes (**Figure 6**). Le reste, moins de 10 %, utilise d'autres cycles que celui de Calvin : il existe cinq autres cycles biochimiques de fixation du  $\text{CO}_2$  connus à ce jour. On utilise le terme « cycle » pour signifier que la suite de réactions biochimiques se referme sur elle-même en un cercle.

Une première ligne d'études s'intéresse à l'amélioration du processus de photosynthèse.

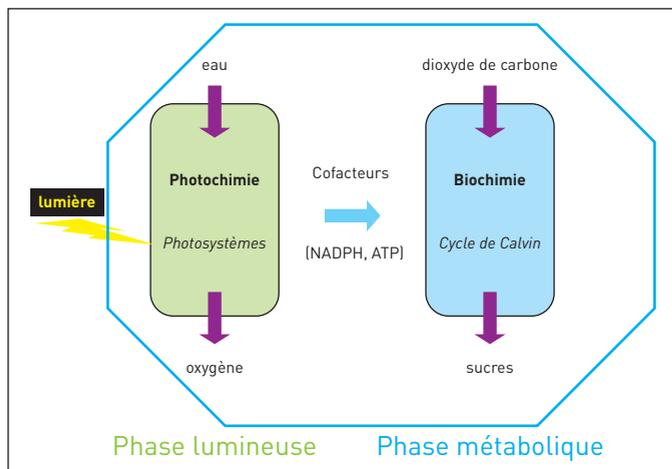
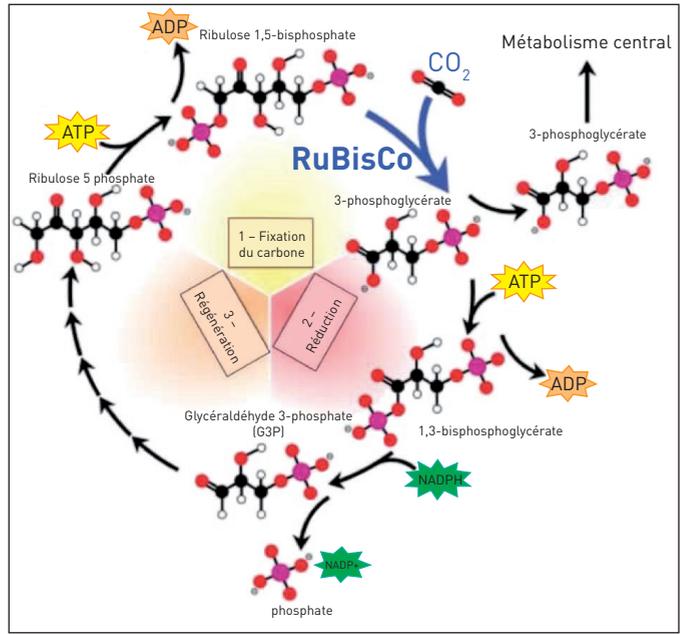


Figure 5

**Les deux phases de la photosynthèse.** La phase lumineuse (à gauche) fait appel dans les membranes des thylakoïdes de chloroplastes à des centres réactionnels ; elle transforme l'énergie solaire en énergie biochimique sous forme d'ATP tout en recyclant des cofacteurs comme NADPH. La phase « métabolique » (à droite) fait appel dans le stroma des chloroplastes au cycle de Calvin ou ses équivalents ; elle fixe le carbone du  $\text{CO}_2$  pour former des sucres.

Les limites de la photosynthèse, et les pistes pour les dépasser, sont bien identifiées (Michel, 2012). Seuls 47 % de l'énergie solaire sont absorbés. Il semble possible de modifier les pigments pour étendre le spectre absorbé. Les photosystèmes saturent au-delà de 20 % de l'intensité maximale du soleil. Ce point serait améliorable en réduisant, soit le nombre de complexes collecteurs de photons par centre de réaction, soit la latence photoprotectrice qui suit le retour à une exposition modérée après une période de forte lumière (Taylor & Long, 2017 ; Kromdijk *et al.*, 2016). L'enzyme RuBisCO, qui insère du CO<sub>2</sub> dans le ribulose-1,5-bisphosphate (Figure 6), fonctionne de manière sous-optimale, notamment parce qu'elle fixe aussi O<sub>2</sub> en compétition avec CO<sub>2</sub>, auquel cas elle exécute de la « photorespiration » au détriment de la fixation de carbone. Cependant il est connu que la RuBisCO d'algues rouges discrimine mieux entre CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> que celle de plantes vertes. Ceci suggère une piste d'amélioration des algues vertes, un projet parmi plusieurs qui sont en cours (Erb & Zarzycki, 2016). Une amélioration encore plus radicale consisterait à modifier le photosystème II pour produire directement de l'hydrogène utilisable comme source d'énergie ; cependant les multiples altérations à apporter aux protéines du photosystème II constituent un défi, même pour les méthodes récentes issues de la biologie de synthèse (Volgusheva *et al.*, 2013). Les diverses limitations rappelées ci-dessus devraient



**Figure 6**

**Le cycle de Calvin** est une suite cyclique de réactions biochimiques chez les organismes photosynthétiques. Il a lieu dans le stroma des chloroplastes chez les eucaryotes, ou dans le cytoplasme chez les procaryotes. Il opère en trois étapes : fixation du CO<sub>2</sub> catalysée par la RuBisCO, réduction du glycérate et régénération du ribulose. Les cofacteurs d'oxydo-réduction et de phosphorylation sont notés sur fonds colorés. Adapté depuis le travail de Mike Jones via Wikipédia.

en principe mener à une efficacité photosynthétique de 4,5-6 %, alors qu'en pratique elle n'atteint que rarement 1 % (Blankenship *et al.*, 2011). Il existe donc une marge d'optimisation, qui pourrait être envisagée dans une ou plusieurs des directions indiquées ci-dessus.

#### De 3 à 4 carbonés

Une seconde ligne d'études, très liée au processus de photosynthèse aussi, vise à modifier des plantes de considérable intérêt agricole comme le riz, pour que leur efficacité photosynthétique théorique augmente de 4,5 à 6 %. En effet, certaines plantes comme le maïs montrent une anatomie photosynthétique particulière.

Dans leurs feuilles, les tissus photosynthétiques sont entourés d'autres tissus dont les carboxylases très actives forment des acides organiques à 4 carbones (« C4 »). Ces acides organiques migrent ensuite dans le tissu photosynthétique sous-jacent. Leur décarboxylation entraîne une forte concentration de CO<sub>2</sub> près des sites catalytiques de la RuBisCO, cependant que la concentration de O<sub>2</sub> est inchangée. Ainsi, cette disposition anatomique favorise la fonction de carboxylase de RuBisCO au détriment de sa fonction d'oxygénase qui est responsable du phénomène de photorespiration (d'autres travaux visent spécifiquement à diminuer cette photorespiration). Au contraire, de nombreuses plantes d'intérêt agronomique comme le riz forment des composés à 3 carbones (« C3 ») et sont plus nettement affectées par le phénomène de photorespiration diminuant leur capacité à fixer le carbone, accumuler de la biomasse et former des grains. Il se trouve que le riz a une anatomie foliaire proche de celle des plantes en C4. Aussi est-il envisagé dans certains travaux de modifier le riz du type naturel en C3 vers celui en C4 (Wang *et al.*, 2016 ; Sudershan *et al.*, 2017).

#### *Croissance végétale*

Une troisième ligne d'études porte sur le choix des plantes, et leur éventuelle amélioration, pour une croissance rapide permettant de maximiser la biomasse produite en une saison sur une surface donnée, si possible sur des terres peu appropriées aux grandes cultures

nourricières. Les améliorations concernent le rendement en biomasse, et la croissance et le développement de la plante. Ainsi, les plantes favorites en zone tempérée incluent le peuplier (un arbre), le miscanthe (un jonc), et particulièrement le panic raide (une herbe, en anglais « *switchgrass* »). Par exemple, des projets d'analyse puis d'amélioration génétique délibérée du panic raide sont en cours (Meyers, 2015 ; Nageswara-Rao *et al.*, 2013 ; Casler *et al.*, 2011).

#### *Saccharification*

Une quatrième ligne d'études vise à améliorer la saccharification – la transformation des sucres complexes de la plante en sucres simples – ou à modifier la structure et la composition de la paroi cellulaire avec pour objectif de faciliter sa déconstruction chimique et/ou enzymatique. Cette ligne vise à la bioproduction de composés chimiques ou de biocarburants (Yuan *et al.*, 2008 ; Himmel, 2007 ; Gressel, 2008 ; Kalluri *et al.*, 2014 ; Nageswara-Rao *et al.*, 2013).

#### *Résistances des plantes et lutte contre les résistances de leurs parasites*

Une cinquième ligne d'études s'attaque au problème de résistances des parasites aux pesticides disponibles dont le nombre n'augmente plus guère depuis plusieurs années. Ce problème est abordé avec des approches de biologie de synthèse. Il en est de même d'une autre question, la résistance des plantes auxdits parasites, mais aussi à la sécheresse ou à d'autres conséquences du glissement

climatique. Ces deux questions, liées par les méthodes utilisées ou envisagées, font l'objet de revues récentes (Borel, 2017 ; Scheben & Edwards, 2017 ; Schenke & Cai, 2020) qui renvoient à une liste pertinente de publications de recherche.

#### Fixation d'azote atmosphérique

Une sixième ligne d'études tente de permettre aux céréales d'utiliser, comme le font les légumineuses, l'azote atmosphérique en tant que ressource. Un succès dans ce domaine réduirait drastiquement les besoins en engrais azotés pour un ensemble de plantes cultivées massivement à des fins nutritionnelles, ainsi que les dépenses énergétiques nécessaires à produire et transporter ces engrais. De complexes interactions entre les racines de la légumineuse et une bactérie du genre *Rhizobium* résultent dans la formation de nodules spécialisés dans la fixation d'azote atmosphérique. Pendant plusieurs décennies, de nombreux travaux ont étudié cette symbiose et ont proposé principalement trois pistes pour la transposer aux céréales. La première piste consiste à transférer vers les céréales les gènes des légumineuses qui sont requises pour le développement de la symbiose dans des nodules racinaires. La seconde approche est de créer des céréales fixant l'azote sans nodules, en les associant à des endophytes capables de fixer l'azote (Cocking *et al.*, 2005) et en usant d'approches de biologie de synthèse pour adapter ou améliorer les performances de ces bactéries colonisatrices

(Geddes *et al.*, 2015 ; Ryu *et al.*, 2020). La troisième piste vise à directement introduire l'enzyme nitrogénase catalysant la fixation d'azote dans le patrimoine génétique de la plante (Buren *et al.*, 2017). Aucune piste n'a connu de succès opérationnel jusqu'à présent. À chaque évolution significative de l'état de l'art, l'espoir renaît. Il en a été de même avec l'avènement de la biologie de synthèse (Rogers & Oldroyd, 2014 ; Mus *et al.*, 2016).

#### Fixation de carbone

Une dernière ligne d'études, plus radicale et encore éloignée de toute application concrète, a pour objectif de proposer une alternative synthétique aux six voies naturelles de fixation de CO<sub>2</sub> décrites jusqu'alors, dont le cycle de Calvin est le plus massif représentant (revues par Morot-Gaudry & Boudet, 2018 ; Morot-Gaudry & Pernollet, 2020). Usant d'une approche de biologie de synthèse, des chercheurs allemands ont élaboré *in vitro* un cycle de fixation continue de CO<sub>2</sub>. Ce cycle totalement artificiel est basé sur un réseau de réactions impliquant 17 enzymes choisies dans 9 organismes issus des 3 domaines du vivant. Certaines de ces enzymes ont en outre été optimisées par génie enzymatique. En particulier, la carboxylase utilisée est dépourvue d'activité oxygénase, à rebours de la RuBisCO. Ce cycle, dit « CETCH », convertit le CO<sub>2</sub> en molécules organiques à la vitesse de 5 nanomoles de CO<sub>2</sub> par minute et par milligramme de protéines (Schwander *et al.*, 2016 ; **Encadré 2**).

## ENCADRÉ 2

### Fixation de carbone par une voie optimisée totalement synthétique

En 2016 paraissait un article remarquable dans lequel Schwander *et al.* appliquaient les principes de la biologie de synthèse pour remplacer le cycle de Calvin par un cycle totalement différent et artificiel, mais rendant les mêmes services avec des performances supérieures d'un ordre de grandeur. Ce cycle artificiel est appelé « Crotonyl-Coenzyme A /Ethylmalonyl-Coenzyme A/Hydroxybutyryl-Coenzyme A », avec pour acronyme « CETCH ». Précisons d'emblée que leur cycle synthétique ne fonctionne actuellement que dans l'éprouvette, et non dans le vivant.

Les travaux de ces auteurs allemands comportent deux grandes phases : conception et construction.

#### A) CONCEPTION

##### 1) Identification d'une carboxylase efficace

Ces chercheurs ont classé des carboxylases naturelles de divers organismes selon leur efficacité dans la réaction de carboxylation normalement effectuée par la RuBisCo. Une part de leur efficacité tient à l'absence de la réaction parasite de photorespiration.

##### 2) Retrosynthèse métabolique

Partant de cette carboxylation qu'on va appeler réaction « 0 », ils sont remontés vers la réaction précédente, dite « -1 », dans le cycle en cours de conception. Plusieurs possibilités existent pour cette réaction « -1 ». Pour chaque possibilité en « -1 », ils sont ensuite remontés à ce que pourraient être des réactions possibles se produisant encore avant, dites « -2 ». Et ainsi de suite. Si comme souvent il y a plusieurs possibilités pour toute réaction amont, on se retrouve vite avec un immense arbre de combinaisons possibles. Or l'objectif est de déterminer le meilleur chemin dans cet arbre touffu, donc de déterminer le meilleur ensemble de réactions successives finissant par la carboxylation « 0 ».

##### 3) Élagage

Pour élaguer l'arbre touffu en ne gardant qu'une branche à chaque niveau, les auteurs ont utilisé une série de critères. En particulier, chaque réaction doit être possible au plan thermodynamique ; par exemple, elle ne se produirait pas si, pour avoir lieu, elle réclamait de l'énergie qui ne lui est pas fournie. Ou encore, le cycle global s'arrêterait rapidement si n'étaient pas régénérés les cofacteurs biochimiques comme le NADP. En outre, un cycle synthétique intéressant doit produire beaucoup d'énergie sous forme biochimique comme l'ATP. L'arbre est tellement touffu qu'une inspection à l'œil nu n'y suffit pas. Aussi les chercheurs disposent-ils d'outils informatiques pour appliquer l'ensemble de ces critères à l'élagage.

##### 4) Identification d'enzymes candidates

Pour chaque réaction du futur cycle, des enzymes capables de la catalyser doivent être identifiées dans la littérature scientifique et dans les bases de données alimentées par les chercheurs du monde entier.

#### B) CONSTRUCTION

##### 1) Vérification des enzymes candidates

Une à une, les enzymes identifiées en A4) sont maintenant caractérisées à la paillasse par la mesure de leurs paramètres catalytiques et cinétiques.

##### 2) Reconstruction de la voie métabolique

Dans la même éprouvette sont réunies toutes les enzymes requises pour la voie métabolique cyclique. En ajoutant les réactifs initiaux, le flux de leurs transformations successives à travers cette voie est mesuré. L'identité des produits de ces réactions successives est confirmée par chromatographie en phase liquide haute performance et/ou par spectrométrie de masse.

### 3) Optimisation de la voie métabolique

À ce stade, des modifications destinées à harmoniser le fonctionnement de la voie métabolique dans son entier deviennent nécessaires. Par exemple, il est indispensable de s'assurer du recyclage des cofacteurs du type NAD ou NADP, afin que la voie puisse « tourner » cycliquement plus d'un petit nombre de tours. Durant cette étape, certaines enzymes vont être altérées par génie enzymatique pour favoriser l'activité catalytique souhaitée. Par exemple, il faudra introduire une activité Oxydase dans une enzyme qui à l'origine est une Deshydrogenase : ainsi, une méthylsuccinyl-CoenzymeA deshydrogenase sera altérée en une méthylsuccinyl-CoenzymeA oxydase qui utilise l'oxygène moléculaire.

### 4) Évaluation finale du cycle métabolique complet

La voie cyclique est mise en œuvre, et les paramètres globaux (catalytiques, cinétiques, flux, bilans énergétiques etc.) sont mesurés et comparés au cahier des charges initial. En particulier, un réactif de départ, le  $^{13}\text{CO}_2$ , est introduit avec un traceur isotopique  $^{13}\text{C}$ . Si besoin est, l'expérimentaliste revient à l'étape précédente.

Bien entendu, un long chemin reste à effectuer pour insérer ce cycle synthétique dans un métabolisme photosynthétique complet. La même équipe, collaborant avec une équipe française de microfluidique, a franchi en 2020 une étape en couplant le cycle synthétique CETCH (**Encadré 2**) à des membranes photosynthétiques isolées à partir de chloroplastes d'épinard (Miller *et al.*, 2020). Ces membranes utilisent l'énergie lumineuse pour régénérer ATP et NADPH (**Figure 5**, à gauche), cependant que le cycle CETCH convertit le  $\text{CO}_2$  en une source de carbone pour la synthèse de composés organiques. Le couplage a été obtenu en faisant cohabiter ces membranes d'origine naturelle et les enzymes du cycle CETCH dans des pico-vésicules. Ces dernières sont faites de lipides englobant une phase aqueuse et ayant la taille approximative de cellules. Elles sont placées au sein de chambres microfluidiques permettant un contrôle partiel des réactions biochimiques y prenant place. Malgré ce succès, il convient de noter que les membranes se dégradent rapidement sous l'effet des radicaux libres de

l'oxygène, et aussi que le système ne fonctionne que grâce à l'addition de pièges redox comme la protéine ferredoxine.

Un autre objectif serait de transposer un cycle fonctionnant dans l'éprouvette au sein d'une cellule vivante. Quelques étapes vers cet objectif ont récemment été franchies. En particulier, l'équipe allemande a modifié profondément le métabolisme d'une bactérie afin d'y introduire le cycle de Calvin pour fixer le  $\text{CO}_2$  (Schada von Borzyskowski *et al.*, 2018). Cette bactérie, *Methylobacterium extorquens*, est naturellement apte à croître avec le méthanol pour unique source de carbone. Dans la bactérie altérée, le méthanol reste utilisé comme source d'énergie, donc l'autotrophie n'est pas totale ; ce qui est nouveau est que le  $\text{CO}_2$  devient sa seule source de carbone pour fabriquer sa biomasse. Cette altération a demandé que les productions de biomasse et d'énergie soient découplées par l'inactivation de trois gènes, et qu'un équivalent hétérologue du cycle de Calvin soit implémenté (**Figure 7**).

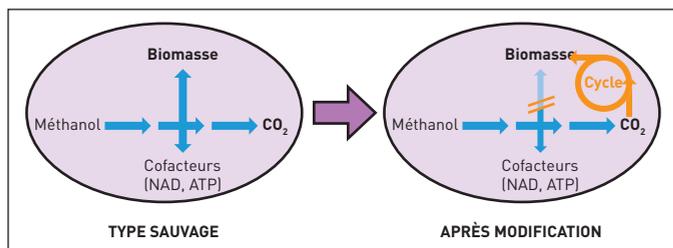


Figure 7

**Fixation du  $\text{CO}_2$  par une bactérie méthyloprote *Methylobacterium extorquens* AM1.** L'assimilation du méthanol pour produire la biomasse bactérienne a été interrompue en inactivant trois gènes, découplant ainsi l'acquisition d'énergie – qui continue de venir du méthanol – et la production de biomasse, qui après modification vient uniquement du  $\text{CO}_2$ , via un équivalent du cycle de Calvin. Les modifications par rapport à la bactérie d'origine sont notées en orange (inspiré de Schada von Borzyskowski et al., 2018).

Indépendamment, des équipes autrichiennes ont altéré le métabolisme d'une levure hétérotrophe d'intérêt industriel, *Pichia pastoris*, pour la rendre autotrophe, capable de pousser en continu avec pour seule source de carbone du  $\text{CO}_2$  (Gassler et al., 2020). Cette

levure est méthyloprote, elle a naturellement la capacité d'assimiler le méthanol dans certaines de ses organites appelées « peroxysomes ». Le circuit métabolique d'assimilation du méthanol a été « détourné » par ces chercheurs pour réaliser une voie de fixation du  $\text{CO}_2$  ressemblant au cycle de Calvin. Pour la première partie de ce travail faisant appel à une conception et une ingénierie rationnelles, il a fallu inactiver trois gènes de *P. pastoris* et importer huit gènes hétérologues. Durant la seconde partie, pour augmenter la vitesse de croissance de la nouvelle souche autotrophe, cette dernière a été soumise à des cycles d'évolution adaptative en laboratoire. Il s'agit donc d'un cas récent où la biologie de synthèse a été mise à profit pour rendre totalement autotrophe une cellule vivante normalement hétérotrophe.

## Conclusion

Nous ne pouvons que saluer la récente salve de projets explorant tous azimuts, les projets dont les plus marquants ont été résumés ci-dessus. À titre d'illustration, un centre de recherche particulièrement emblématique des approches de biologie de synthèse appliquées aux plantes est brièvement décrit dans l'**Encadré 3** ci-dessous. En tout cas, il n'est pas surprenant que les approches les plus radicales, par exemple la refonte totale du cycle de fixation du  $\text{CO}_2$ , soient aussi celles qui se positionnent le plus en amont des applications. Ces approches novatrices ne font actuellement qu'effleurer le monde vivant, généralement celui des micro-organismes. Quand elles seront ancrées dans

### ENCADRÉ 3

#### Focus sur le projet phare britannique OpenPlant

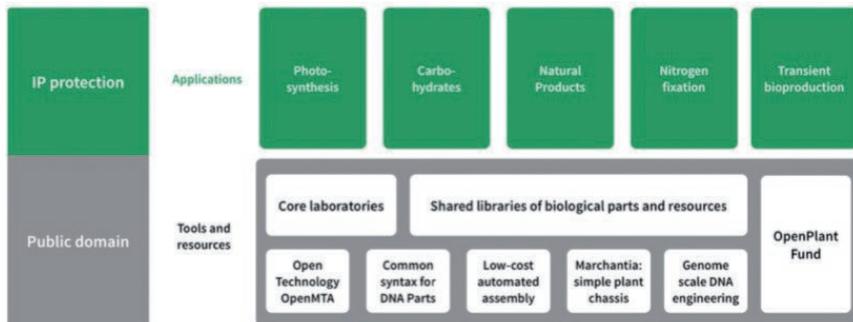


Le projet OpenPlant est à ce jour la plus emblématique des initiatives appliquant les principes, concepts et outils de la biologie de synthèse au monde végétal (site web de OpenPlant : [www.openplant.org](http://www.openplant.org)). Encore en activité, il est né en 2014 comme l'un des six centres de recherche en biologie de synthèse (« Synthetic Biology Research Centre » ou « SBRC ») au Royaume-Uni. C'est le seul des six SBRC à être dédié au monde végétal. Il regroupe une vingtaine d'équipes appartenant à trois entités, l'Université de Cambridge, le John Innes Centre, et le Earlham Institute. Ces deux dernières institutions sont localisées à Norwich, assez proche de Cambridge. Les directeurs de ce SBRC sont Anne Osbourn et Jim Haseloff. Ce SBRC a reçu un financement national de 12,5 millions de livres sterling.

Les objectifs principaux de OpenPlant (détaillés plus avant dans la figure ci-dessous) sont :

- de développer de nouveaux outils et méthodes pour la biologie de synthèse des plantes ;
- d'appliquer ces outils à des projets ambitieux de modifications de traits phénotypiques ;
- de mettre en place des mécanismes et conventions pour le partage de ressources normalisées ;
- de favoriser les échanges interdisciplinaires, le rayonnement national et international, et la sensibilisation et l'éducation du grand public.

Ce SBRC est par exemple engagé dans les travaux mentionés plus haut sur la fixation de l'azote par des plantes non légumineuses.



le monde vivant, resteront encore à valider des solutions appropriées aux conditions du champ, pour lequel d'autres facteurs environnementaux (régime météorologique, apports azotés) viennent limiter la production de biomasse. Certains chercheurs imaginent d'implanter en dehors du monde vivant des solutions à grande échelle, dont l'avantage évident est une manipulation aisée, une grande liberté créative, et l'économie du métabolisme non directe-

ment productif qui permet à l'être vivant de se reproduire et de se maintenir. Cependant, ces solutions, comme déjà le montre le cas des membranes d'épinard qui se dégradent rapidement, perdent en même temps les avantages du monde vivant, en particulier la croissance rapide et prolongée et les propriétés auto-réparatrices et homéostatiques. Nous voyons ici se dessiner les termes d'un compromis entre les solutions basées ou non sur le vivant ; compromis qui évoluera avec les progrès techniques.

Toutefois, il est trop tôt pour savoir quelles seront les avancées qui mèneront à des innovations à grande échelle, parmi celles qui viennent d'être discutées ou d'autres qui n'ont pas encore percé. Une certitude émerge pourtant, par analogie avec le passé récent, et au vu de la situation planétaire évoquée en introduction : les adaptations variétales des plantes, les modifications plus complexes des plantes et des animaux et l'usage raisonné de la biomasse vont dorénavant occuper une place croissante dans les préoccupations techniques, scientifiques, énergétiques, économiques, politiques, et éthiques de l'humanité. La pression démographique et le glissement climatique rendront de plus en plus intenable les positions de principe visant à interdire les méthodes les plus efficaces pouvant être utilisées pour réaliser ces adaptations. Alors les gains en efficacité et rapidité que permet le domaine mouvant de la biologie de synthèse et ses futurs épigones ne constitueront plus un atout pour certains, mais une nécessité pour tous.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Académie des technologies. *Rapport « Archiver les mégadonnées au-delà de 2040 : la piste de l'ADN »*, 2020.
- Blankenship RE *et al.* Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science*. 2011 May 13;332(6031):805-9.
- Borel B. CRISPR, Microbes and more are joining the war against crop killers. *Nature* 2017; 543:302-304.
- Buren S, Young EM, Sweeny EA, Lopez-Torrejón G, Veldhuizen M, Voigt CA, Rubio LM. Formation of Nitrogenase NifDK Tetramers in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*. 2017 Jun 16;6(6):1043-1055.
- Casler, MD, Tobias CM, Kaeppler SM, Buell CR, Wang Z, Cao P, Schmutz J, Ronald P. The Switchgrass Genome: Tools and Strategies. *Plant Genome* 2011; 4:273-282.
- Csorgo B, Feher T, Timar E, Blattner FR et Pósfai G. Low-mutation-rate, reduced-genome *Escherichia coli*: an improved host for faithful maintenance of engineered genetic constructs. *Microb Cell Fact*. 2012;11:11.
- Cocking EC, Stone PJ, Davey MR. Symbiosome-like intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *Sci China C Life Sci*. 2005 Dec;48 Spec No:888-96.
- Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 2013 Jan;15:55-66.
- Deng Y, Ma L, Mao Y. Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods. *Biochemical Engineering J*. 2016; 105:16-26.
- Dickinson RE, Cicerone RJ. Future Global Warming from Atmospheric Trace Gases. *Nature* 1986; 319:109-115.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096.
- Dymond JS *et al.* Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature* 2011;477:471-6.
- ERASynBio, The European Research Area network in Synthetic Biology. Strategic Vision (2014).
- Erb TJ, Zarzycki J. Biochemical and synthetic biology approaches to improve photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation. *Current Opinion in Chemical Biology* 2016; 34:72-79.
- Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular Systems Biol*. 2013; 9:641.
- Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000 Jan 20;403(6767):339-42.
- Gassler T *et al.* The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. *Nat Biotechnol*. 2020 February ; 38(2): 210-216.
- Geddes BA, Ryu MH, Mus F, Garcia Costas A, Peters JW, Voigt CA, Poole P. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N<sub>2</sub>-fixation to cereals. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Apr;32:216- 222.
- Gibson DG *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010;329:52-6.
- Gressel J. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci*. 2008;174:246-263.
- Hauptmann V, Weichert N, Menzel M, Knoch D, Paegle N, Scheller J, Spohn U, Conrad U, Gils M. Native-sized spider silk proteins synthesized *in planta* via intein-based multimerization. *Transgenic Res*. 2013 Apr;22(2):369-77.
- Himmel ME. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 2007;315:804-807.
- Jabbar A, Zulfiqar F, Mahnoor M, Mushtaq N, Zaman MH, Din ASU, Khan MA, Ahmad HI. Advances and Perspectives in the Application of CRISPR-Cas9 in Livestock. *Mol Biotechnol*. 2021 May 26.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier EA. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816- 21.
- Kalluri UC, Yin H, Yang X, Davidson BH. Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance. *Plant Biotechnol J*. 2014;12:1207-1216.
- Képès F. La biologie de synthèse, plus forte que la Nature ? Le Pommier, 2011.
- Képès F. Réinventer le vivant. Quels enjeux pour la biologie de synthèse. *Pour la Science* n°440 (juin 2014) page 28.
- Képès F, éditeur. Dossier « biologie de synthèse », *Biofutur* (janvier 2013).
- Kromdijk J, Glowacka K, Leonelli L, Gabilly ST, Iwai M, Niyogi KK, Long SP. Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection. *Science*. 2016 Nov 18;354(6314):857-861.
- Lu T, Yang B, Wang R, Qin C. Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front Immunol*. 2020 Jan 23;10:3060.
- Luisi PL. The Emergence of Life (Cambridge University Press), 2006. Meyers RA. *In Synthetic Biology*, 2015 (Wiley & Sons), page 672.
- Michel H. The non-sense of biofuels. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012; 51:2516-2518.

- Miller TE, Beneyton T, Diehl C, Girault C, McLean R, Chotel T, Claus P, Socorro Cortina N, Baret JC, Erb TJ. Light-powered CO<sub>2</sub> fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science*. 2020 May 8;368(6491):649-654.
- Ministère de l'Agriculture. Une Stratégie Bioéconomie pour la France, 2017.
- Morot-Gaudry J-F, Pernollet J-C. Chimie du carbone vert renouvelable. Académie d'agriculture de France, 2013.
- Morot-Gaudry JF, Boudet AM. La photosynthèse du futur, vers l'amélioration d'un processus biologique fondamental. Publication 2 de la Fondation de l'Académie des technologies, 2018.
- Morot-Gaudry J-F, Pernollet J-C. Les cyberchloroplastes et la photosynthèse artificielle. Académie d'agriculture de France, 2020.
- Mus F *et al.* Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jun 13;82(13):3698-3710.
- Nageswara-Rao M, Soneji JR, Kwit C, Stewart CN. Advances in biotechnology and genomics of switchgrass. *Biotechnology for Biofuels* 2013;6:77.
- Niu D *et al.* Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017 Sep 22;357(6357):1303-1307.
- Niu W, Draths KM, Frost JW. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog*. 2002 Mar-Apr;18(2):201-11.
- O'Connor SR, Farmer PB, Lander I. Benzene and Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Pathol*. 1999; 189:448-453.
- OpenPlant site web, 2014-2021.
- Rogers C, Oldroyd GED. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot*. 2014 May;65(8):1939-46.
- Ryu MH *et al.* Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. *Nat Microbiol*. 2020 Feb;5(2):314-330.
- Schada von Borzyskowski L, Carrillo M, Leupold S, Glatter T, Kiefer P, Weishaupt R, Heinemann M, Erb TJ. An engineered Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Metab Eng*. 2018 May;47:423-433.
- Scheben A, Edwards D. Genome editors take on crops. *Science* 2017;355(6330):1122-1123.
- Scheller J, Giihrs KH, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*. 2001 Jun;19(6):573-7.
- Schenke D, Cai D. Applications of CRISPR/Cas to Improve Crop Disease Resistance: Beyond Inactivation of Susceptibility Factors. *Science*. 2020 Aug 20;23(9):101478.
- Schwander T, Schada von Borzyskowski L, Burgener S, Cortina NS, Erb TJ. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*. 2016 Nov 18;354(6314):900-904.
- SLU Report, Global Potential of Sustainable Biomass for Energy, 2009.
- Sudershan Mishra S, Mithilesh Kumar Singh MK, Sikha Snehal S, Pathak H. C4 Rice - Tweaking Rice Physiology for Second Green Revolution. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2017;6(12):1161-1176.
- Taylor SH, Long SP. Slow induction of photosynthesis on shade to sun transitions in wheat may cost at least 21% of productivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017 Sep 26;372(1730).
- Thiemens MH, Trogler WC. Nylon Production: An Unknown Source of Atmospheric Nitrous Oxide. *Science* 1991; 251:932-934.
- Thomas R, D'Ari R. Biological feedback (CRC Press, 1990).
- Thompson DB, Aboulhoda S, Hysolli E, Smith CJ, Wang S, Castanon O, Church GM. The Future of Multiplexed Eukaryotic Genome Engineering. *ACS Chem Biol*. 2018 Feb 16;13(2):313-325.
- Volgusheva A, Styring S, Mamedov F. Increased photosystem II stability promotes H<sub>2</sub> production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS USA* 2013; 110(18):7223-7228.
- Wang P, Vlad D, Langdale JA. Finding the genes to build C4 rice. *Curr Opin Plant Biol*. 2016 Jun;31:44-50.
- Woodrow Wilson Center. *Synthetic Biology Products / Applications* (2015).
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN Jr. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci*. 2008;13:421-429.