Chroniques génomiques

Synthétique, vous avez dit « Synthétique » ?

Bertrand Jordan

L'annonce par l'équipe de J. Craig Venter de la synthèse d'un génome bactérien minimal [1] pourrait faire penser que la biologie synthétique a atteint un objectif très ambitieux, celui de la création d'un organisme entièrement conçu par l'homme et synthétisé par voie chimique : le titre complet, *Design and synthesis of a minimal bacterial genome*, va effectivement dans ce sens. On pourrait donc s'attendre à ce que des gènes aient été conçus afin de coder les protéines nécessaires à la vie d'une bactérie, qu'ils aient ensuite été produits à partir d'oligonucléotides de synthèse et enfin assemblés pour constituer un chromosome bactérien, lequel s'avèrerait ensuite capable d'assurer le métabolisme, la croissance et la reproduction d'une bactérie. Bien sûr, il suffit d'un minimum de connaissances sur l'état actuel de la biologie moléculaire pour comprendre que, malgré tous les progrès récents [2] (→), ce schéma ambitieux est encore très au-dessus de nos possibilités. L'article que je vais analyser dans cette chronique ne présente qu'une étape encore préliminaire vers la synthèse de la Vie ; il constitue pourtant un tour de force technologique et est le résultat de près de vingt années d'efforts d'un laboratoire très inventif et performant. Il illustre aussi les limites de nos connaissances actuelles et, à ce titre, revêt une importance biologique qui dépasse son objet immédiat.

(→) Voir la Synthèse
de V. Noireaux, m/s
n° 12, décembre 2015,
page 1126

Un peu d'histoire

En 1995, l'équipe de Venter publiait la séquence du plus petit génome bactérien connu à l'époque, celui de *Mycoplasma genitalium* (580 kilobases) et y détectait 470 gènes [3], chiffre revu à 525 après des analyses plus approfondies. C'est peu par rapport aux quatre ou cinq mille gènes de bactéries comme *Escherichia coli*, et cela s'explique par le fait que les mycoplasmes se développent à l'intérieur des cellules animales (ils sont la plaie des cultivateurs de cellules) et profitent

donc d'un milieu très riche en nutriments. Il était tentant d'y voir une sorte de « génome minimum », et Venter allait continuer à s'intéresser à cette question tout en menant sa compétition avec le programme officiel pour le séquençage du génome humain [4]. Pour essayer de définir un génome réellement minimal, l'équipe mit au point une technique de mutagenèse globale par transposons lui permettant d'inactiver les gènes un à un et de dresser une liste de gènes non essentiels (du moins en apparence, voir plus loin).

Deux mises au point techniques importantes allaient permettre d'aller plus loin : un système d'assemblage d'un génome bactérien à partir d'oligonucléotides de synthèse [5], prouesse technique sur laquelle je reviendrai, et la découverte d'une méthode de transfert d'un chromosome bactérien entier dans une bactérie différente, sans recombinaison et avec élimination du chromosome d'origine [6]. Ce dernier procédé est spécifique aux mycoplasmes qui ont l'avantage de ne pas posséder la solide paroi bactérienne habituelle et qui peuvent absorber un chromosome circulaire de 500 kilobases sans le rompre. Entre temps l'équipe avait changé de modèle, passant à *Mycoplasma mycoides* (qui se multiplie bien plus vite en culture), la bactérie réceptrice étant *Mycoplasma capricolum*. En 2010, une première démonstration était réussie, avec la synthèse totale du génome de *M. mycoides* (1 079 kilobases), et son transfert dans *M. capricolum*, aboutissant à des cellules viables ne contenant que le chromosome

UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille,
Université/ EFS/CNRS,
Espace éthique méditerranéen,
hôpital d'adultes la Timone,
264, rue Saint-Pierre,
13385 Marseille Cedex 05,
France ;
CoReBio PACA, case 901,
parc scientifique de Luminy,
13288 Marseille Cedex 09,
France.
bertrand.jordan@univ-amu.fr
brjordan@orange.fr

Figure 1. Synthetic Genomics, entreprise fondée par Venter en 2007.

synthétique. Le groupe pouvait donc annoncer la « création d'une cellule bactérienne contrôlée par un génome synthétisé par voie chimique » [7]. Tour de force qui ouvrait la voie à la manipulation du génome synthétique afin de le réduire encore pour définir un jeu minimum de gènes, objet de l'article de mars 2015 [1].

L'échec d'un *design* rationnel

Le point de départ était donc le génome de *M. mycoides*, ou plutôt sa version synthétisée appelée JCVIsyn1.0¹, qui en diffère par quelques courtes séquences ajoutées pour faciliter repérages et manipulations. Ce génome est deux fois plus grand que celui de *M. genitalium*, et comporte neuf cents gènes, mais le temps de génération de la bactérie (1 heure au lieu de 16) et l'expérience de synthèse et transfert déjà acquise [7] militaient en sa faveur. Les auteurs ont alors défini un « génome minimal hypothétique » (HMG, *hypothetical minimum genome*) à partir des connaissances sur la biochimie et le métabolisme bactérien ainsi que de données de mutagenèse par transposons indiquant les gènes non essentiels. Le HMG ainsi défini mesurait 483 kilobases et contenait 471 gènes (dont 39 codant pour des ARN). Ils ont synthétisé cet ADN en huit segments, et ont construit par recombinaison des génomes contenant un de ces segments et les sept autres en provenance de JCVIsyn1.0 : l'idée était de vérifier la viabilité de chacun de ces segments individuellement (dans un « fond » JCVIsyn1.0) puis de les assembler entre eux afin de constituer le génome minimum attendu. Mais aucun des huit segments n'a donné un produit viable² : ce *design* rationnel ne fonctionne pas ! Il ne s'agit pas d'erreurs de synthèse ou d'assemblage, toutes les étapes de ce processus complexe sont soigneusement contrôlées, et le fait que des cellules viables soient obtenues avec le génome synthétique JCVIsyn1.0 atteste que la technique est au point. Ce que montre ce résultat, c'est que même pour un tout petit génome bactérien, nous ne sommes pas encore capables de définir *a priori* le jeu de gènes nécessaire à la vie.

¹ On retrouve les initiales de J. Craig Venter...

² Sauf l'un d'eux, mais avec une multiplication très lente.

Le recours à l'expérience

Il a donc fallu obtenir des données supplémentaires sur le caractère essentiel ou non de chacun des gènes et, en fait, construire un génome minimum par éliminations successives et non par *design a priori*. Cela a nécessité de multiples *rounds* (séries) de mutagenèse par transposon Tn5 (l'un des premiers transposons identifiés), suivis d'analyses détaillées et de synthèse du génome bactérien selon les indications obtenues. Celui-ci est alors transféré dans *M. capricolum* et l'on peut alors tester sa viabilité et sa croissance. Il est indiqué dans l'article que le cycle complet (du *design* à la bactérie) peut maintenant être réalisé en trois semaines, ce qui est remarquable si l'on songe qu'il inclut notamment la construction d'un ADN circulaire de 500 kilobases environ à partir d'oligonucléotides longs de 50 bases. Cela implique de multiples étapes, avec assemblages successifs, clonage des fragments intermédiaires dans *E. coli* ou dans la levure, vérifications de séquence... Et ce n'est qu'une des étapes à réaliser en trois semaines. Au cours de ces essais, il s'est avéré notamment que certains gènes catalogués comme « non essentiels », car n'altérant pas la viabilité lorsqu'ils étaient interrompus par un transposon, étaient en fait indispensables – mais qu'un autre gène pouvait suppléer leur fonction. Si les deux gènes sont inactivés (ou absents), la cellule n'est plus viable... Finalement, et sans rentrer dans les détails, l'équipe de Venter est arrivée à un jeu « approximativement minimal » de gènes en testant, par différentes voies expérimentales, lesquels pouvaient être éliminés sans altérer la viabilité du produit final. Même si le chromosome bactérien est à chaque fois obtenu par synthèse, on est donc assez loin du rêve de la biologie synthétique tel qu'il est formulé au début de cette chronique. Le produit final, baptisé JCVI-syn3.0, possède un génome de 531 kilobases portant 473 gènes ; il a un temps de doublement en culture de trois heures (contre une seule pour JCVI-syn1.0 et seize pour *M. genitalium*) et une morphologie assez proche de celle de son « parent » syn1.0.

Les leçons du génome bactérien minimal

Puisque syn3.0 a été construit à partir de syn1.0 de manière expérimentale et non à partir de principes premiers, il est maintenant intéressant d'analyser *a posteriori* la composition de son génome et les fonctions des gènes qu'il porte. C'est là que se situe le résultat le plus surprenant de ce travail : sur les 438 gènes codant pour des protéines (les 35 autres dirigeant la synthèse d'ARN ribosomiques et de transfert), 149 (soit plus de 30 %) ne peuvent être rattachés à aucune fonction biologique précise. Ce sont soit des séquences auxquelles on ne peut

attribuer aucun type d'activité, soit des protéines que l'on peut rattacher à une catégorie fonctionnelle (des kinases, par exemple) mais dont on ignore tant le substrat que le rôle biologique. Il n'est donc pas étonnant que la voie du *design* rationnel ait échoué, puisque l'on constate qu'il faut un tiers de gènes « inconnus » pour arriver à un génome viable. Cela montre le chemin qu'il reste à faire pour aboutir à un véritable génome synthétique constitué en assemblant un jeu défini *a priori* de gènes de fonction connue – sans même envisager le *design* d'un gène à partir de principes premiers. Cela indique aussi que nous n'en sommes pas encore, et de loin, à une description complète du fonctionnement d'un des organismes les plus élémentaires.

Cela dit, le travail considérable effectué depuis vingt ans dans le laboratoire de Venter fournit des informations intéressantes et des pistes prometteuses. L'analyse des gènes connus portés par l'ADN de syn3.0 (70 % du total) montre que ceux qui sont liés à l'expression de l'information génétique en constituent plus de la moitié, la réplique de l'ADN en concerne moins d'un dixième, le reste étant réparti entre les constituants de la membrane cellulaire et ceux du métabolisme au niveau du cytoplasme. Au cours des multiples *rounds* de construction, les chercheurs ont pu également expérimenter différentes modifications du génome et ont notamment montré qu'ils pouvaient réorganiser les gènes en les regroupant sur l'ADN par catégories fonctionnelles, sans altérer la viabilité. Ils ont aussi pu tester l'effet de changements dans la structure des ARN ribosomiques et même de modifications dans l'usage des codons, et constater qu'en général la bactérie reste viable. Il leur reste bien sûr à élucider la fonction des 149 gènes inconnus.

Au-delà de ces aspects, les perspectives à plus long terme sont nombreuses. Elles reposent sur la poursuite des travaux de l'équipe et leur aboutissement, à terme, à des génomes dans lesquels la fonction de chaque gène sera connue, un objectif ambitieux mais probablement réalisable. On pourrait alors s'attaquer réellement à la modélisation informatique du fonctionnement de la cellule, qui a été l'objet de nombreuses tentatives jusqu'ici mais reste aléatoire tant que la composition génique de l'organisme à modéliser reste mal connue. Sur le versant

industriel, cela faciliterait grandement la mise au point de microorganismes capables de produire des carburants, des médicaments ou des compléments alimentaires (acides gras oméga-3) : c'est l'objectif de l'entreprise *Synthetic Genomics*, fondée en 2007 sous l'égide de Venter (Figure 1). D'une manière générale, la manipulation de tels « génomes de synthèse » (ou plutôt de semi-synthèse, puisque chaque gène reste une copie de la version naturelle) ouvrirait de nombreuses possibilités. On peut néanmoins se demander si une approche reposant sur une utilisation systématique des possibilités de modification du génome bactérien, grâce notamment à la technique CRISPR-cas9, ne serait pas susceptible d'apporter de nombreuses réponses à moindres frais : c'est peut-être une course qui s'engage actuellement entre l'approche par synthèse et celle reposant sur des modifications ciblées [8], course qui aboutira sans doute à la combinaison des deux techniques... ♦

SUMMARY

Synthetic, really?

The synthesis of a minimal bacterial genome comprising only 473 genes is an impressive achievement, yet it is only a step towards a really synthetic genome based on first principles: this set of genes was derived from a larger genome by successive elimination of non-essential genes, and 149 of the final 473 genes have no specific (known) biological function. It is nevertheless an important stepping stone towards fully designed minimal genomes. ♦

RÉFÉRENCES

1. Hutchison CA 3rd, Chuang RY, Noskov VN, *et al.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016 ; 351 : aad6253.
2. Noireaux V. Construction de cellules synthétiques. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1126-32.
3. Fraser CM, Gocayne JD, White O, *et al.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 1995 ; 270 : 397-403.
4. Olson MV. The Human genome project: a player's perspective. *J Mol Biol* 2002 ; 319 : 931-42.
5. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkuch C, *et al.* Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 2008 ; 319 : 1215-20.
6. Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, *et al.* Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 2007 ; 317 : 632-8.
7. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010 ; 329 : 52-6.
8. Callaway E. Minimal cell raises stakes in race to harness synthetic life. *Nature* 2016 ; 531 : 557-8.

TIRÉS À PART

B. Jordan

Tarifs d'abonnement m/s - 2016

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 654 dans ce numéro de m/s