

► Depuis les dix dernières années, les techniques de synthèse et d'assemblage d'ADN se sont grandement améliorées. La construction de molécules d'ADN synthétiques devient maintenant beaucoup plus simple et abordable de sorte qu'il est possible de reconstruire des chromosomes synthétiques complets. Nous assistons donc aux débuts de la génomique synthétique, qui vise la construction de génomes conçus sur mesure pour l'étude et l'utilisation de systèmes biologiques. De la synthèse des premiers génomes viraux jusqu'à la reconstruction des seize chromosomes de la levure, en passant par la première cellule bactérienne contrôlée par un génome entièrement synthétique, nous discutons des découvertes majeures, des aspects réglementaires et éthiques ainsi que du potentiel de cette nouvelle discipline pour le futur. ◀

Au cours des 20 dernières années, le séquençage d'ADN s'est fortement démocratisé et son coût a considérablement diminué, passant de 100 millions de dollars par génome en 2001 à moins de 1 000 dollars aujourd'hui. Cette technologie, très largement répandue dans les laboratoires médicaux et de recherche, s'est même introduite dans les foyers en permettant aux particuliers d'obtenir la séquence de leurs propres génomes. Bien que les coûts actuels soient encore élevés, la synthèse d'ADN est appelée à connaître un essor similaire et devenir dans un futur proche un outil incontournable dans le domaine des biotechnologies. Les récentes innovations technologiques permettent de générer des molécules d'ADN toujours plus grandes et plus nombreuses. En 1979, le premier gène synthétique était constitué de 207 paires de bases (pb) [1]. Depuis, des fragments d'ADN de plus d'un million de pb (Mpb) ont été synthétisés et assemblés atteignant, pour certains, la taille de chromosomes complets [2,3] (Figure 1). Ces avancées marquent les débuts de l'ère de la « génomique synthétique », une discipline émergente de la biologie se situant à l'interface entre science et

# Chromosomes synthétiques

## Réécrire le code de la vie

Vincent Baby<sup>1,2</sup>, Fabien Labrousseau<sup>3</sup>,  
Carole Lartigue<sup>1,2</sup>, Sébastien Rodrigue<sup>4</sup>



<sup>1</sup>INRA, UMR 1332 de biologie du fruit et pathologie, 71 avenue E. Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>2</sup>Univ. Bordeaux, UMR 1332 de biologie du fruit et pathologie, 71 avenue E. Bourlaux 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup>Institute of veterinary bacteriology of Bern, Vetsuisse Faculty, University of Bern, 3001 Berne, Suisse.

<sup>4</sup>Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boulevard de l'Université, J1K 2R1 Sherbrooke, Québec, Canada.

[Sebastien.Rodrigue@USherbrooke.ca](mailto:Sebastien.Rodrigue@USherbrooke.ca)

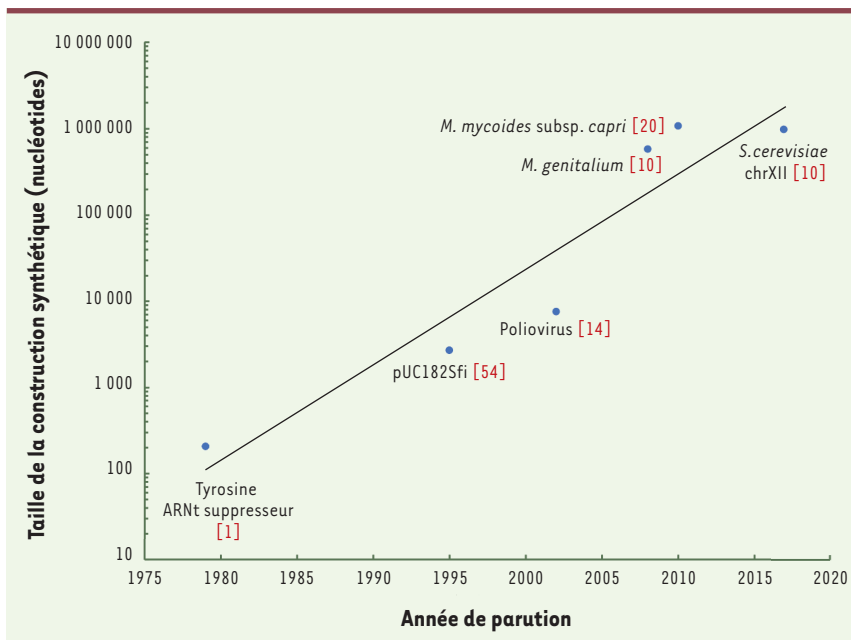
ingénierie et dont l'un des objectifs est de créer des organismes dont les génomes auront été complètement prédéterminés.

Après avoir résumé les techniques permettant de synthétiser et d'assembler de grandes molécules d'ADN, nous présenterons dans cette revue les résultats marquants de cette nouvelle discipline, la réglementation actuelle, qui incite à la vigilance, les aspects éthiques de cette recherche, ainsi que les développements attendus pour les prochaines années.

### Techniques de synthèse et d'assemblage de fragments d'ADN

Bien que de nouvelles technologies de synthèse de molécules fondées sur l'utilisation d'enzymes soient en cours de développement et suscitent beaucoup d'intérêt [4], il n'existe pas encore de méthode permettant de créer chimiquement de longues molécules d'ADN sans accumuler un nombre important de mutations [5]. Les techniques actuelles reposent donc sur un assemblage progressif de courts fragments d'ADN simple-brin, les oligonucléotides, pour lesquels le taux d'erreur demeure relativement faible pour des tailles atteignant jusqu'à 200 nucléotides. La production de ces oligonucléotides par l'approche traditionnelle de la chimie des phosphoramidites<sup>1</sup> stagne depuis quelques années à un coût d'environ 0,05-0,15 dollar par nucléotide en fonction de la quantité produite. Cependant, l'introduction récente de puces à ADN permet d'augmenter considérablement le

<sup>1</sup> Les nucléosides phosphoramidites sont utilisés depuis les années 1980 pour la synthèse chimique d'ADN. Cette réaction progresse en ajoutant un nucléotide de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' des molécules et utilise habituellement un support solide ainsi qu'un groupement protecteur.



**Figure 1. Évolution de la capacité de synthèse de génomes entiers en fonction du temps.**

Les techniques de synthèse et d'assemblage permettent de produire des constructions d'ADN de plus en plus grandes, qui peuvent maintenant atteindre plusieurs millions de nucléotides.

recombinaison *in vivo*<sup>4</sup> [8]. Des molécules d'ADN dont la taille finale varie de quelques centaines de pb jusqu'à plusieurs mégabases [9] peuvent ainsi être assemblées (Figure 2). Alors que des assemblages de taille inférieure ou égale à 10 kpb peuvent facilement être conservés en solution ou amplifiés de nouveau par PCR, si nécessaire, les assemblages de plus grandes tailles doivent être maintenus dans un vecteur. Ces vecteurs contiennent généra-

lement une origine de réplication à copie unique, un système de partitionnement, et au moins un marqueur de sélection. Ces éléments permettent d'assurer la pérennité des fragments d'ADN clonés chez l'organisme hôte choisi. Par exemple, les BAC (*bacterial artificial chromosome*) sont utilisés chez les bactéries comme *Escherichia coli*, les YAC (*yeast artificial chromosome*) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les HAC (*human artificial chromosome*) dans des cellules humaines et les PAC (*plant artificial chromosome*) chez les plantes. Le développement de protocoles de transformation efficaces permettant d'introduire ces longues molécules d'ADN dans un organisme d'intérêt représente aussi un aspect essentiel pour l'utilisation de tels chromosomes. L'électroporation a d'abord été la méthode privilégiée, mais elle s'avère difficile pour des constructions dépassant 0,5 Mpb [10]. La transformation de sphéroplastes<sup>5</sup> [11], la transplantation de génomes [12] et la transformation par fusion cellulaire [13] dans la levure ont par la suite été développées. Ces méthodes permettent la transformation des cellules avec des molécules d'ADN plus grandes, certaines pouvant même dépasser 1,5 Mpb.

nombre de molécules produites et de diminuer significativement le prix des oligonucléotides à moins de 0,01 dollar par nucléotide. Ces puces servent de support physique sur lequel un grand nombre d'oligonucléotides de séquences différentes peuvent être synthétisés en parallèle, augmentant ainsi le rendement de la production. Ces courtes molécules d'ADN simple-brin peuvent ensuite être assemblées en utilisant des méthodes souvent apparentées à la réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction* ou PCR) afin d'obtenir des fragments d'ADN pouvant atteindre quelques centaines à quelques milliers de pb (Figure 2). Plusieurs entreprises proposent de synthétiser ces fragments à un coût inférieur à 100 dollars par millier de pb (kpb), incitant ainsi les clients à commander des séquences d'ADN « prêtes à l'emploi » plutôt que de les amplifier par PCR puis, si nécessaire, de les assembler pour obtenir le produit désiré. Malgré des avantages certains en termes de gain de temps et d'argent, certaines contraintes demeurent. En effet, de nombreuses séquences restent encore difficiles à synthétiser à l'heure actuelle, notamment les séquences ayant un contenu en bases G et C très faible ou très élevé, ou encore des séquences présentant des structures secondaires, des répétitions ou des homopolymères.

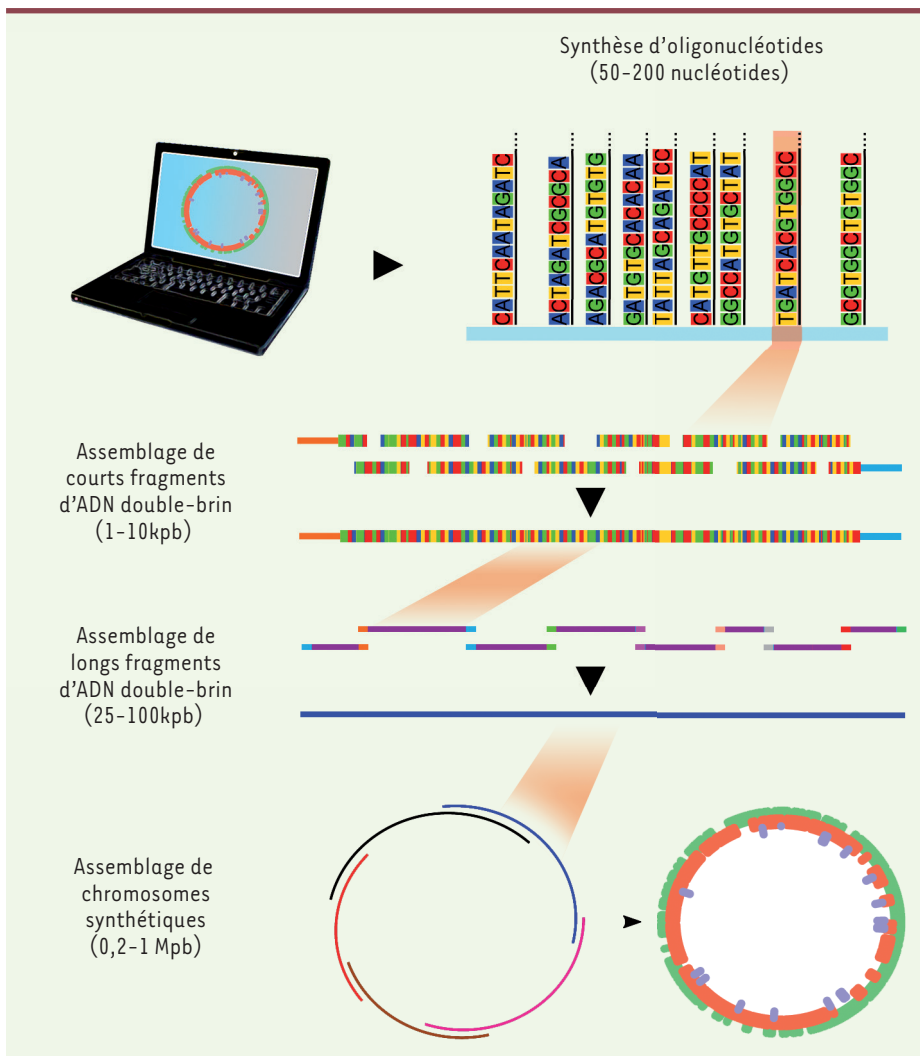
Les fragments ainsi obtenus (comprenant entre 0,3 et 10 kpb) lors d'une synthèse initiale (Figure 2) peuvent à leur tour être combinés par assemblages itératifs en faisant appel à des techniques telles que l'assemblage de Gibson<sup>2</sup> [6], le *Golden Gate*<sup>3</sup> [7] ou la

<sup>2</sup> La méthode de Gibson permet d'assembler des fragments d'ADN. Elle est fondée sur la génération d'extrémités cohésives entre fragments suite à la dégradation partielle des extrémités 5' par l'exonucléase T5. Les extrémités complémentaires des fragments ainsi dénudés se lient spécifiquement par hybridation avant qu'une ADN polymérase et une ligase thermostable permettent de les joindre de manière covalente.

<sup>3</sup> La technique de Golden Gate repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction de type IIS clivant l'ADN en aval de leur site de liaison, créant ainsi une extrémité cohésive de quelques nucléotides dont la séquence peut être déterminée par l'expérimentateur. Des fragments possédant des extrémités cohésives compatibles peuvent ainsi être assemblés dans un ordre précis à l'aide d'une ligase d'ADN.

<sup>4</sup> La recombinaison homologe peut être suffisamment efficace chez certains organismes comme la levure pour permettre de joindre des fragments d'ADN dans un ordre dépendant de séquences parfaitement homologues présentes à l'extrémité des molécules à assembler.

<sup>5</sup> Levure dépourvue de sa paroi, exposant sa membrane plasmique.



**Figure 2. Résumé des étapes de conception et de construction d'un génome synthétique.** Des oligonucléotides synthétisés chimiquement sont habituellement assemblés *in vitro* en éléments pouvant atteindre quelques milliers de paires de bases (pb). Ceux-ci peuvent ensuite être combinés *in vivo* ou *in vitro* pour former des fragments pouvant aller jusqu'à environ 100 kpb. Finalement, un assemblage de ces fragments peut être complété *in vivo* pour obtenir des chromosomes complets de l'ordre du Mpb.

permis d'établir les bases des futurs assemblages de génomes. Depuis, plusieurs autres virus ont été synthétisés, comme le génome du bactériophage T7, celui du virus de la grippe espagnole de 1918 ou encore du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Tableau 1). À l'heure actuelle, la synthèse de génomes viraux, que ce soit pour des virus à ADN ou à ARN, des virus pathogènes ou non-pathogènes, et quelles que soient leurs tailles (quelques milliers à plusieurs

centaines de nucléotides), pose relativement peu de difficultés. Elle fournit un outil puissant pour étudier la fonction des gènes et mieux appréhender les mécanismes gouvernant la pathogénicité des virus. Il est aussi possible de recoder entièrement ces génomes viraux en jouant, par exemple, sur la dégénérescence des codons. Ces altérations permettent d'envisager des stratégies de lutte totalement inédites. Par exemple, des vaccins candidats, à base de virus atténués ou après modification de leurs spécificité d'hôtes, sont actuellement à l'étude [16-19].

Quelques années après la synthèse du génome du phage ΦX174, l'équipe de Venter a publié la synthèse complète d'un premier génome bactérien, celui de *Mycoplasma genitalium* [10]. Cette bactérie, qui possède le plus petit génome naturel permettant à une cellule de croître de manière autonome, appartient à la classe des *Mollicutes*, dont les membres sont caractérisés par leur petit génome et l'absence de paroi cellulaire. Le génome de *M. genitalium* a pu être assemblé de manière

### Les génomes synthétiques : des virus aux cellules eucaryotes

Plus la taille d'une molécule d'ADN à assembler est grande, plus sa construction et son introduction dans un organisme à modifier deviennent complexes. Il n'est donc pas surprenant que les génomes viraux de petites tailles (5 à 30 kpb), aient été les premiers à être synthétisés.

Le premier génome entièrement synthétique fût celui du poliovirus, l'agent responsable de la poliomyélite, en 2002 [14]. Ce génome de 7 740 nucléotides a été synthétisé en trois fragments issus d'oligonucléotides synthétiques. Les fragments ont ensuite été clonés dans des plasmides qui ont enfin été combinés par digestion et ligation enzymatiques. La transcription de cet ADN synthétique en ARN viral a généré des poliovirus infectieux après transfection [14]. En 2003, l'équipe de John Craig Venter a développé une méthode d'assemblage de fragments d'ADN qui a permis de reconstruire le génome du bactériophage ΦX174 en moins de 15 jours [15]. Chacun des deux brins d'ADN du virus ont été synthétisés en courts oligonucléotides de 42 bases qui ont été assemblés dans une réaction inspirée de la PCR pour obtenir un seul chromosome linéaire de 5 386 pb. Ces deux expériences ont

	Génome synthétisé	Taille (kpb)	Référence
Virus	Poliovirus PV1(M)	7,6	[14]
	Bactériophage ΦX174	5,4	[15]
	Virus de la grippe espagnole de 1918	~13,0	[48]
	HERV-K(HML-2)	9,5	[55]
	Bat SARS-like-SCoV	29,7	[56]
	VIH-1-C	11,0	[57]
	Bactériophage G4	5,6	[58]
	Virus de l'hépatite C sous-type 1a	9,6	[59]
	Bactériophage S13-like	5,4	[60]
	CHIKV	11,9	[61]
	Virus de la mosaïque du tabac	6,4	[62]
	GALV-NF	4,7	[63]
	PRRSV	15,4	[64]
	AcMNPV	145,3	[65]
Procaryotes	Virus de la variole équine	212,8	[49]
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	583,0	[8,10]
	<i>Mycoplasma mycoides subsp. capri</i>	1077,9	[20]
	JCVI-syn3.0	531,5	[3]
Eucaryotes et organelles	ADNm de souris	16,3	[28]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrIII</i>	272,8	[33]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrII</i>	770,0	[34]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrX</i>	707,4	[37]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrXII</i>	976,0	[2]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrV</i>	536,0	[35]
	<i>Saccharomyces cerevisiae chrVI</i>	242,7	[36]

**Tableau 1. Chromosomes synthétiques publiés à ce jour.**

progressive en utilisant une approche hiérarchique : des petits fragments d'ADN d'environ 5 à 7 kpb ont d'abord été assemblés *in vitro* en fragments de plus en plus grands (jusqu'à environ 144 kpb), correspondant à des quarts de génomes, et propagés dans la bactérie *E. coli*. Les quarts de génomes ont ensuite été assemblés par recombinaison homologue chez la levure *S. cerevisiae* pour obtenir un chromosome complet de 580 kpb. Cette méthode a par la suite été améliorée pour reconstruire le génome de *Mycoplasma mycoides* sous-espèce *capri*, en utilisant uniquement la levure *S. cerevisiae* [20]. Ce génome a pu être transplanté dans la bactérie *Mycoplasma capricolum* sous-espèce *capricolum*, pour produire la première bactérie contrôlée par un génome synthétique. La poursuite de ces travaux a permis, en 2016, la création d'une bactérie au génome minimal (JCVI-syn3.0) duquel la majorité des gènes non-essentiels ont été retirés [3]. De nombreux projets visant à apporter des modifications extensives au génome naturel d'autres bactéries d'intérêt sont en cours, comme en témoigne le récent développement de deux souches d'*E. coli* n'utilisant respectivement que 59 et 57 codons des 64 habituellement retrouvés chez tous

les autres organismes [21, 22]. Le projet *Minibacillus*, à l'image de JCVI-syn3.0, a, lui, pour objectif d'obtenir une souche minimale de la bactérie modèle *Bacillus subtilis* [23, 24] pour la caractériser entièrement et déterminer le rôle précis de chaque gène essentiel. Des projets de réductions des génomes de *Streptomyces avermitilis* [25, 26] et *Pseudomonas putida* [27] sont également en cours.

À la limite entre l'eucaryote et le procaryote, un chromosome mitochondrial de souris a déjà été synthétisé entièrement à partir d'oligonucléotides en seulement 5 jours [28]. En revanche, un tel génome n'a pas encore été introduit dans une mitochondrie vivante puisque les techniques de transformation de cette organelle restent difficiles à mettre en œuvre [29].

La suite logique consiste à générer les chromosomes d'un organisme eucaryote, ce qui a été initié il y a quelques années dans le cadre du projet *Saccharomyces*

*cerevisiae* 2.0 (Sc2.0). Plusieurs laboratoires à travers le monde ont uni leurs efforts dans le but de synthétiser les 16 chromosomes de cette levure [30]. Le projet Sc2.0 ne vise pas seulement à recopier la séquence du génome. Certaines modifications, comme la délétion de plusieurs introns non-essentiels et le remplacement de tous les codons d'arrêt de la traduction (codons STOP) UAG par un équivalent UAA, ont aussi été apportées. L'insertion d'un site de recombinaison *loxP* à la suite de chaque gène non-essentiel permet également l'utilisation de la méthode SCRaMBLE (*synthetic chromosome recombination and modification by loxP-mediated evolution*) [31] visant à mélanger aléatoirement l'ordre des gènes afin d'obtenir puis d'étudier de nouvelles organisations génomiques supportant la vie. À la différence des projets précédents, les chromosomes de la levure Sc2.0 ne sont pas réassemblés pour ensuite être introduits intégralement dans la cellule. Des fragments de chromosomes natifs sont en effet remplacés progressivement par leurs équivalents modifiés, d'une taille de 30 à 60 kpb. La modification du génome est donc plus lente puisque la reconstruction d'un seul chromosome peut prendre plus d'une trentaine de cycles de remplacement nécessitant chacun des étapes de vérification portant autant sur la viabilité de la souche que sur la validité de la séquence introduite [2]. La reconstruction du génome Sc2.0 a débuté il y a environ 10 ans par la synthèse d'un des bras des chromosomes VI et IX de la levure [32] et s'est poursuivie avec la publication de la synthèse complète du chromosome III trois ans plus tard [33]. Par la suite, le consortium a annoncé la synthèse des chromosomes II [34], V [35], VI [36], X [37] et XII [2] dans un numéro spécial de *Science*. La reconstruction du génome de la levure se poursuit et culminera avec le rassemblement des différents chromosomes ainsi synthétisés dans une seule et même souche, ce qui devrait permettre d'obtenir le premier organisme eucaryote portant un génome synthétique.

Les chromosomes artificiels sont également des outils convoités par des chercheurs étudiant les plantes. Sans pouvoir actuellement synthétiser des chromosomes complets *de novo*, des chromosomes natifs peuvent être tronqués en mini-chromosomes qui peuvent être modifiés. Cet outil a déjà été utilisé chez plusieurs organismes tels que le maïs [38], *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames) [39,40], le riz [41] et l'orge [42]. Des avancées importantes ont également été rapportées dans la construction et la manipulation de chromosomes de chloroplastes<sup>6</sup>, beaucoup plus faciles à assembler et à modifier que les chromosomes nucléaires [43]. Il est également possible de les transformer en utilisant des méthodes comme la biolistique<sup>7</sup> [44]. Le consortium international *Genome Project-Write* (GP-write), formé en 2016 dans le but de promouvoir le développement des technologies permettant la synthèse et l'initialisation des génomes, propose de synthétiser un génome humain modifié et de l'introduire dans une lignée cellulaire [45] (→).

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 10, octobre 2016, page 898

Plusieurs laboratoires, par exemple aux États-Unis, en Chine, en Angleterre, au Canada et au Japon, ont signifié leur intérêt à y participer [46]. Plusieurs aspects, tant technologiques qu'éthiques, devront cependant être davantage développés avant d'entreprendre cette tâche colossale. Actuellement, une douzaine de projets pilotes sont en cours, dont un portant sur l'ingénierie de lignées cellulaires afin de les rendre plus sûres et d'améliorer leurs propriétés pour des applications biotechnologiques [47] (→).

Il n'est cependant pas question de modifier des organes ou des cellules germinales dans le cadre de ce projet.

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 8-9, août-septembre 2018, page 749

## Réglementation et considérations éthiques

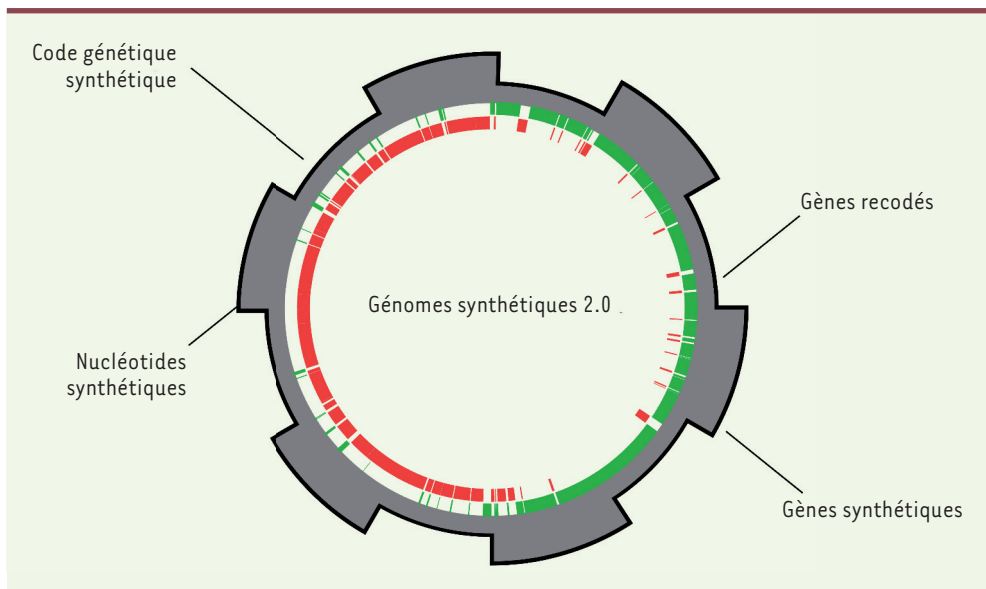
La capacité à synthétiser des chromosomes et des génomes provoque certains débats. La synthèse du virus de la grippe espagnole de 1918 [48] et la récente création d'une version chimérique du virus de la variole équine [49] ont soulevé plusieurs questions sur le développement accidentel ou délibéré d'organismes potentiellement dangereux [52] (→).

(→) Voir le Forum de J.N. Tourier, *m/s* n° 2, février 2019, page 181

Bien que l'utilisation d'organismes pathogènes et de toxines soit bien réglementée, il y a encore peu de règles législatives déterminant les séquences de nucléotides qui peuvent être synthétisées. Face aux inquiétudes, le *Department of health and human services* (HHS) américain a publié en 2009 un document intitulé *Screening framework guidance for providers of synthetic double-stranded DNA*. Ce document décrit une procédure volontaire à appliquer par les compagnies offrant des services de synthèse d'ADN pour contrôler l'utilisation de séquences à des fins malveillantes. Les grandes lignes de cette approche consistent à établir l'identité des acheteurs et à déterminer si les séquences qu'ils commandent peuvent représenter une menace. Cette stratégie d'autogouvernance par les compagnies a été adoptée pour permettre aux chercheurs ayant les équipements et la connaissance requise pour manipuler des organismes potentiellement dangereux, d'effectuer leur recherche sans contraintes majeures. Plusieurs compagnies se sont concertées pour fonder le consortium *International gene synthesis consortium* (IGSC) dont les membres doivent suivre les recommandations du HHS. Ces entreprises représentent 80 % des fournisseurs de séquences dans le monde, assurant ainsi un certain niveau de contrôle du risque biologique. Les risques associés à la biologie de synthèse ont également été évalués en décembre 2010 par la *Presidential commission for the study of bioethical*

<sup>6</sup> Le chloroplaste est un organelle qui assure la photosynthèse des végétaux. Comme la mitochondrie, le chloroplaste contient une molécule d'ADN circulaire, ou chromosome chloroplastique.

<sup>7</sup> Cette technique est fondée sur la propulsion à très haute vitesse de particules sur lesquelles est greffé de l'ADN. Elle a été développée afin d'effectuer des transfections à travers la paroi des cellules végétales.



**Figure 3. Les génomes synthétiques du futur.** Les progrès de la génomique synthétique mèneront à des génomes ayant des propriétés différentes de celles observées dans la nature. Le développement de nucléotides synthétiques et l'utilisation de codes génétiques alternatifs permettront de créer des cellules artificielles dont le matériel génétique ne correspond à aucun autre organisme retrouvé dans la nature.

issues (PCSB). Dans un rapport publié sous le titre *New directions: the ethics of synthetic biology and emerging technologies*, il est conclu que les capacités actuelles de la biologie de synthèse ne représentent pas un danger en fonction des connaissances scientifiques. Il recommande toutefois une réévaluation de ces capacités au fil des années pour légiférer si un risque plus concret se manifeste. La génomique synthétique possède donc un potentiel important pour mieux comprendre la vie ou pour de nouvelles applications biotechnologiques. Il reste néanmoins essentiel de demeurer vigilant pour éviter les usages éventuellement dangereux ou malicieux.

La synthèse de chromosomes pose également des questions d'ordre éthique. Dans un avenir prochain, la synthèse de chromosomes humains sera techniquement possible et, combinée aux avancées d'ingénierie de génome, des modifications majeures du génome humain pourront être effectuées. Il sera par exemple possible de rendre résistantes des cellules contre certaines maladies ou de leur ajouter de nouvelles voies métaboliques. Bien que certaines de ces applications puissent être bénéfiques dans le cadre de la recherche, il est important de se demander si de telles pratiques sont souhaitables en médecine. En 1997, lors de la 29<sup>e</sup> session de la conférence générale de l'Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture (UNESCO), la Déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme a été adoptée. En plus d'interdire le clonage humain destiné à la reproduction, cette déclaration vise aussi à protéger la dignité du génome humain. Durant cette même conférence, la Déclaration sur les responsabilités des générations présentes envers les générations futures a aussi statué que le génome humain doit être protégé et sa biodiversité sauvegardée. Ces déclarations ne demandent pas de limiter la recherche, mais plutôt de l'exercer avec prudence. L'utilisation de sujets humains n'est pas une option à considérer, même si certaines modifications pourraient sembler avantageuses à court terme. En effet, une telle pratique pourrait diminuer la diversité génétique humaine et ainsi affecter l'adaptabilité de notre espèce à long terme.

### La génomique synthétique : promesses, déploiements et applications futures

Bien que les techniques de synthèse de chromosomes permettent, en principe, la création de nouvelles séquences génomiques inédites, les projets rapportés à ce jour demeurent très fortement inspirés des organismes retrouvés dans la nature. Les séquences, la composition en gènes et l'architecture des chromosomes n'ont en effet pas encore fait l'objet d'un grand nombre de modifications qui, collectivement, permettront de faire émerger les principes fondamentaux régissant l'ingénierie des génomes. Lorsque ces principes de base seront mieux compris, des efforts de conception rationnelle pourront plus facilement être entrepris, en intégrant des outils informatiques de modélisation cellulaire et de conception assistée par ordinateur. Ces outils permettront non seulement de prédire efficacement les phénotypes attendus, mais aussi d'établir l'architecture détaillée des chromosomes. Ces génomes pourront être organisés en modules regroupant des fonctions communes, qui seront combinés selon les besoins spécifiques de l'organisme désiré. Les cellules produites pourront ainsi contenir des gènes recodés, utilisant des codons synonymes ou n'existant pas dans la nature (Figure 3), ou inclure diverses machineries cellulaires spécialisées ou des combinaisons de voies métaboliques actuellement inexistantes. Une variété d'applications pourront alors être envisagées comme la production de molécules d'intérêt, la bioremédiation, le traitement de maladies ou encore la création de vaccins plus efficaces.

Un autre axe en développement vise à créer des organismes utilisant des nucléotides non-canoniques dans leur génome (Figure 3). Ceci permettrait non seulement de distinguer les organismes synthétiques des organismes naturels, mais également de leur conférer des caractéristiques intéressantes [50] (→).

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, m/s n° 2, février 2018, page 179

Un avantage de cet ADN artificiel est qu'il impose une dépendance à des nucléotides n'existant pas naturellement, limitant ainsi la dissémination dans l'environnement des organismes génétiquement modifiés.

L'utilisation de nouvelles bases azotées pour la synthèse de l'ADN [53] (→) implique l'écriture de nouveaux codes génétiques, ce qui permettra d'immuniser l'organisme contre les virus utilisant des codes naturels.

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, m/s n° 5, mai 2019, page 483

Cette approche permettra également de limiter l'expression de gènes acquis lors de potentiels événements d'échange de matériel génétique par transfert horizontal entre organismes naturels et synthétiques. L'incompatibilité entre les codes naturels et synthétiques serait à l'origine d'erreurs de traduction des protéines, en causant des interruptions précoces ou en menant à l'incorporation d'acides aminés inappropriés. Des acides aminés non-naturels pourraient être incorporés par certains de ces codons non-utilisés ou synthétiques, offrant ainsi des capacités structurales ou enzymatiques améliorées pour diverses protéines. Une souche de la bactérie *E. coli* possédant des nucléotides non-naturels a déjà été produite [51] et des souches utilisant un code génétique réduit sont disponibles [21, 22].

## Conclusion

Les avancées technologiques spectaculaires des dernières années nous permettent d'assister aux prémices de l'ère de la génomique synthétique. Les défis sont encore nombreux avant d'atteindre le plein potentiel de cette discipline émergente, mais il est probable qu'elle transformera la recherche fondamentale et appliquée dans un futur proche [66] (→).

(→) Voir la Synthèse de F. Labrousseau et al., page 761 de ce numéro

La capacité de synthèse massive d'ADN promet également d'accélérer les recherches en sciences biologiques en plus de constituer un outil important en biologie de synthèse pour répondre aux multiples obstacles auxquels l'humanité devra faire face au cours de ce siècle. ♦

## SUMMARY

### Synthetic chromosomes: rewriting the code of life

The past decade has seen vast improvements in DNA synthesis and assembly methods. The creation of synthetic DNA molecules is becoming easier and more affordable, such that entire chromosomes can now be synthesized. These advances mark the beginning of synthetic genomics, a new discipline interested in the construction of complete genomes tailored for the study and application of biological systems. From viral genome synthesis to the reconstruction of the yeast 16 chromosomes, we discuss the main discoveries, the regulations and ethical considerations along with the potential of this emerging discipline for the future. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Sekiya T, Takeya T, Brown EL, et al. Total synthesis of a tyrosine suppressor transfer RNA gene XVI. Enzymatic joinings to form the total 207-base pair-long DNA. *J Biol Chem* 1979 ; 254 : 5787-801.
2. Zhang W, Zhao G, Luo Z, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. *Science* 2017 ; 355 : eaaf3981.
3. Hutchison III CA, Chuang R-Y, Noskov VN, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016 ; 351 : 1414-26.
4. Palluk S, Arlow DH, Rond T De, et al. De novo DNA synthesis using polymerasenucleotide conjugates. *Nat Biotechnol* 2018 ; 36 : 645-50.
5. Kosuri S, Church GM. Large-scale de novo DNA synthesis: Technologies and applications. *Nat Methods* 2014 ; 11 : 499-507.
6. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009 ; 6 : 343-5.
7. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 2008 ; 3 : e3647.
8. Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 20404-9.
9. Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, et al. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. *Nat Biotechnol* 2000 ; 18 : 1086-90.
10. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 2008 ; 319 : 1215-20.
11. Lartigue C, Vashee S, Algire MA, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* 2009 ; 325 : 1693-6.
12. Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, et al. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 2007 ; 317 : 632-8.
13. Karas BJ, Jablanovic J, Irvine E, et al. Transferring whole genomes from bacteria to yeast spheroplasts using entire bacterial cells to reduce DNA shearing. *Nat Protoc* 2014 ; 9 : 743-50.
14. Cello J, Paul A V., Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 2002 ; 297 : 1016-8.
15. Smith HO, Hutchison C a, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 15440-5.
16. Brown M, Lleras R, Mehedi M, et al. Genetic stability of genome-scale deoptimized RNA virus vaccine candidates under selective pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E386-95.
17. Nouen C Le, Luongo C, Yang L, et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 13169-74.
18. Yurovsky A, Mueller S, Ward CB, et al. Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 4749-54.
19. Wimmer E, Paul AV. Synthetic poliovirus and other designer viruses: What have we learned from them? *Annu Rev Microbiol* 2010 ; 65 : 583-609.
20. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010 ; 329 : 52-6.
21. Fredens J, Wang K, la Torre D de, et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature* 2019 ; 569 : 514-8.
22. Ostrov N, Landon M, Guell M, et al. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science* 2016 ; 353 : 819-22.
23. Reuß DR, Altenbuchner J, Mäder U, et al. Large-scale reduction of the *Bacillus subtilis* genome : Consequences for the transcriptional network, resource allocation, and metabolism. *Genome Res* 2017 ; 27 : 289-99.
24. Reuß DR, Commichau FM, Gundlach J, et al. The blueprint of a minimal cell: MiniBacillus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016 ; 80 : 955-87.
25. Ikeda H, Satoshi KS. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014 ; 41 : 233-50.
26. Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 2646-51.

## RÉFÉRENCES

27. Leprince A, Lorenzo V De, Völler P, et al. Random and cyclical deletion of large DNA segments in the genome of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 2012 ; 14 : 1444-53.
28. Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 901-3.
29. Lightowers RN. Mitochondrial transformation: time for concerted action. *EMBO Rep* 2011 ; 12 : 480-1.
30. Richardson SM, Mitchell LA, Stracquadanio G, et al. Design of a synthetic yeast genome. *Science* 2017 ; 355 : 1040-4.
31. Dymond J, Boeke J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioeng Bugs* 2012 ; 3 : 168-71.
32. Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature* 2011 ; 477 : 471-6.
33. Annaluru N, Muller H, Mitchell LA, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 2014 ; 344 : 55-8.
34. Shen Y, Wang Y, Chen T, et al. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. *Science* 2017 ; 355 : eaaf4791.
35. Xie Z-X, Li B-Z, Mitchell LA, et al. "Perfect" designer chromosome V and behavior of a ring derivative. *Science* 2017 ; 355 : eaaf4704.
36. Mitchell LA, Wang A, Stracquadanio G, et al. Synthesis, debugging, and effects of synthetic chromosome consolidation: synVI and beyond. *Science* 2017 ; 355 : eaaf4831.
37. Wu Y, Li BZ, Zhao M, et al. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X. *Science* 2017 ; 355 : eaaf4706.
38. Yu W, Han F, Gao Z, et al. Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 8924-9.
39. Nelson AD, Lamb JC, Kobrossly PS, et al. Parameters affecting telomere-mediated chromosomal truncation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011 ; 23 : 2263-72.
40. Teo CH, Ma L, Kapusi E, et al. Induction of telomere-mediated chromosomal truncation and stability of truncated chromosomes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2011 ; 68 : 28-39.
41. Xu C, Cheng Z, Yu W. Construction of rice mini-chromosomes by telomere-mediated chromosomal truncation. *Plant J* 2012 ; 70 : 1070-9.
42. Kapusi E, Ma L, Teo CH, et al. Telomere-mediated truncation of barley chromosomes. *Chromosoma* 2012 ; 121 : 181-90.
43. Boehm CR, Bock R. Recent advances and current challenges in synthetic biology of the plastid genetic system and metabolism. *Plant Physiol* 2019 ; 179 : 794-802.
44. Vafaei Y, Staniek A, Mancheno-Solano M, et al. A modular cloning toolbox for the generation of chloroplast transformation vectors. *PLoS One* 2014 ; 10 : e110222.
45. Jordan B. HGP-write : après la lecture, l'écriture ? *Med/Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 898-901.
46. Boeke JD, Church GM, Hessel A, et al. GP-write : a grand challenge project to build and test genomes in living cells. <http://engineeringbiologycenter.org/wp-content/uploads/2018/08/2018-MeetingSummary.pdf>.
47. Jordan B. De HGP-write aux super-cellules. *Med/Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 749-51.
48. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar P V, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005 ; 310 : 77-80.
49. Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0188453.
50. Jordan B. Bases alternatives et organismes synthétiques. *Med/Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 179-82.
51. Zhang Y, Lamb BM, Feldman AW, et al. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : 1317-22.
52. Tournier JN. L'éradication des maladies infectieuses virales mise en danger par les avancées de la biologie synthétique. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 181-6.
53. Jordan B. Extension du domaine du codage : l'ADN hachimoji. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 483-5.
54. Stemmer WPC, Cramer A, Ha KD, et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1995 ; 164 : 49-53.55. Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e10.
56. Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 19944-9.
57. Nauwelaers D, Van Houtte M, Winters B, et al. A synthetic HIV-1 subtype C backbone generates comparable PR and RT resistance profiles to a subtype B backbone in a recombinant virus assay. *PLoS One* 2011 ; 6 : e19643.
58. Yang R, Han Y, Ye Y, et al. Chemical synthesis of bacteriophage G4. *PLoS One* 2011 ; 6 : e27062.
59. Munshaw S, Bailey JR, Liu L, et al. Computational reconstruction of Bole1a, a representative synthetic hepatitis C virus subtype 1a genome. *J Virol* 2012 ; 86 : 5915-21.
60. Liu Y, Han Y, Huang W, et al. Whole-genome synthesis and characterization of viable S13-like bacteriophages. *PLoS One* 2012 ; 7 : e41124.
61. Scholte FEM, Tas A, Martina BEE, et al. Characterization of synthetic Chikungunya virus based on the consensus sequence of recent E1-226V isolates. *PLoS One* 2013 ; 8 : e71047.
62. Cooper B. Proof by synthesis of Tobacco mosaic virus. *Genome Res* 2014 ; 15 : R67.
63. Lovato A, Faoro F, Gambino G, et al. Construction of a synthetic infectious cDNA clone of Grapevine Algerian latent virus (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Viral J* 2014 ; 11 : 186.
64. Vu HLX, Ma F, Laegreid WW, et al. A synthetic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain confers unprecedented levels of heterologous protection. *J Virol* 2015 ; 89 : 12070-83.
65. Shang Y, Wang M, Xiao G, et al. Construction and rescue of a functional synthetic baculovirus. *ACS Synth Biol* 2017 ; 6 : 1393-402.
66. Labrousseau F, Baby V, Rodrigue S, Lartigue C. La transplantation des génomes : redonner vie à des génomes bactériens naturels ou synthétiques. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 761-70.

### TIRÉS À PART

S. Rodrigue

## Étudiants en master, un soutien à la recherche du Comité pour l'histoire de l'Inserm 2019-2020

Pour l'année universitaire 2019-2020, le Comité pour l'histoire de l'Inserm propose un soutien financier aux étudiants de master qui s'engageront dans un mémoire de recherche concernant l'histoire de l'institution ou, plus largement, l'histoire de la recherche biomédicale et des questions de santé.

Les candidats, historiens ou étudiants relevant d'une autre discipline mais intégrant une approche historique, peuvent élaborer, avec l'aide d'un directeur de recherche, leur propre sujet. Un livret de présentation, avec des propositions de sujet, est disponible.

### La date limite de réception des dossiers de candidature est le 18 octobre 2019

Pour toute information, consultez le site Inserm (<https://www.inserm.fr>) et contactez le secrétariat scientifique du

Comité : [celine.paillette@ext.inserm.fr](mailto:celine.paillette@ext.inserm.fr)

Pour télécharger le livret, suivez ce lien : <https://www.inserm.fr/actualites-et-evenements/actualites/soutien-recherche-sur-histoire-recherche-biomedicale-appel-2019-2020>