

Des circuits et des gènes

A. Wagemakers¹, J. M. Buldú¹, J. García-Ojalvo² & M. A.F. Sanjuán¹

¹ Grupo de Dinámica No Lineal y Teoría del Caos

Departamento de Matemáticas y Física Aplicadas y Ciencias de la Naturaleza, Universidad Rey Juan Carlos, Tulipán s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Espagne.

² Departament de Física i Enginyeria Nuclear, Universitat Politècnica de Catalunya, Colom 11, 08222 Terrassa, Espagne.

`alexandre.wagemakers@urjc.es`

Résumé. Nous proposons deux modèles de circuit électronique destiné à simuler la dynamique de réseaux de régulation génétique. Plus particulièrement nous présentons deux circuits reproduisant le comportement de deux réseaux génétiques artificiels dénommés le « repressilator » et le « toggle-switch ». Il s’agit d’un réseau oscillant et d’un interrupteur bistable respectivement. Nous proposons un couplage de plusieurs repressilators afin d’observer l’oscillation cohérente de la population. Grâce au parallèle établi entre les réseaux génétiques et ces circuits électroniques nous montrons que ceux-ci sont utiles pour l’étude de la dynamique et pour la création de nouveaux réseaux génétiques.

Abstract. We propose two models of electronic circuits intended to simulate the dynamics of genetic regulation networks. In particular, we present two circuits reproducing the behavior of two artificial genetic networks called the “repressilator” and the “toggle-switch”. One of them is an oscillating genetic network and the other one is a bistable switch. We propose a coupling of several repressilators in order to observe the coherent oscillation of the population. Based on the analogy established between the genetic networks and these electronic circuits, we show that those are useful for the study of its dynamics and the creation of new genetic networks.

1 Introduction

Les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique ont ouvert de nouveaux horizons et ont soulevé de nombreuses questions sur le fonctionnement des réseaux de régulation génétiques. Après le séquençement entier du génome humain démarre une nouvelle étape avec la compréhension de l’information collecté par les biologistes. Ainsi en 2000 deux équipes de chercheurs [1,3,4] présentèrent deux réseaux génétiques conçus artificiellement à partir de briques de bases, le « repressilator » et le « toggle-switch », et les ont implémenté dans la bactérie *E. coli*. Cette nouvelle discipline, la biologie synthétique, propose d’étudier les réseaux de régulation génétique en construisant des fonctions basiques comme, entre autres, des oscillateurs (le « repressilator ») ou des commutateurs (le « toggle switch »). Mais les exemples de possibles fonctions logiques sont nombreux et peuvent être étudiées théoriquement à l’aide de modèles informatiques [5,6].

Nous présentons ici une nouvelle approche basé sur des circuits électroniques analogiques pour la simulation de tels réseaux de régulation génétique. A l’aide de composants discrets nous simulons la dynamique des deux réseaux précédemment cités et nous étendons la méthode à un ensemble de repressilators couplés de façons globale suivant un modèle proposé par García-Ojalvo *et al.* [2]. Un circuit électronique hybride analogue-digital a été proposé pour la simulation de l’évolution et la sélection de réseaux de régulation négative similaire au répressilator [5]. Néanmoins le modèle décrit ne reproduit pas fidèlement la dynamique mais représente les états du système en forme binaire. Notre approche consiste à reproduire a l’aide de composants MOSFET et de composants analogiques l’évolution des équations différentielles modélisant les réseaux génétiques. Nous avons trouvé des similarités étonnante entre la dynamique des circuits implémentés et la dynamique des systèmes biochimique [8,9]. Le premier circuit proposé est l’équivalent d’un oscillateur génétique composé de trois gènes inter-connecté de façon circulaire lequel présente un variation périodique du niveau des trois protéines. Nous accouplons un ensemble

de ces circuits entre de manière globale et nous étudions les comportements en fonction de la force de l'accouplement. Le deuxième circuit proposé est l'équivalent d'un interrupteur bistable composé de deux gènes. L'état du commutateur est changé par une impulsion brève. La dynamique dans ce cas est décrite très simplement à partir de l'espace des phases et de deux équations différentielles.

2 Le repressilator

Le repressilator [1] est une chaîne de trois gènes represseurs dans lequel chaque represseur empêche l'expression du gène suivant et produisant de cette manière des oscillations autonomes. Dans la Fig. 1 nous représentons de forme schématique les interactions génétiques, les flèches représentent les promoteurs et les rectangles verts les gènes. Chaque represseur produit une protéine s'associant au promoteur suivant et stoppe la production de la protéine correspondante. Ceci mène à une oscillation de l'expression des protéines avec un déphasage de $2\pi/3$. Le repressilator original présente une période d'oscillation inférieure au cycle cellulaire des bactéries. Les oscillations de chaque bactérie deviennent vite indépendante et décorréelées, le bruit des processus génétique et le cycle cellulaire désynchronise rapidement les oscillations. Un mécanisme de communication intercellulaire a été proposé et testé numériquement[2] afin de synchroniser les oscillations de chaque bactérie.

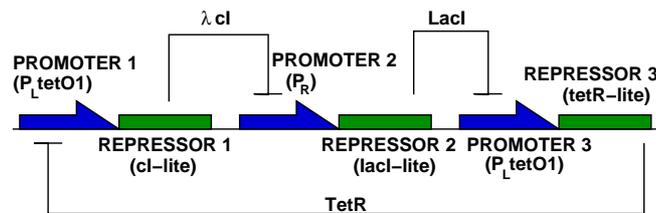


Fig.1. Schéma de l'oscillateur génétique, les flèches représentent les promoteurs des gènes (en vert).

3 Le repressilator électronique

Nous proposons un circuit électronique reproduisant la dynamique du repressilator au moyen de composants discrets (MOSFETS, résistances et condensateurs). La simplicité de l'implémentation permet d'envisager une intégration à grande échelle en vue de simulation de réseaux plus grandes et plus complexes. Le schéma du circuit est présenté dans la Fig. 2.

La cellule de base est entourée en rouge, elle consiste en un transistor MOSFET canal-N couplé à un circuit RC. Le circuit RC est connecté à l'alimentation V_{cc} . La grille du MOSFET joue un rôle similaire à la zone du promoteur d'un opéron. Les tensions représentent les niveaux des protéines associées à chaque gène. Le fonctionnement du circuit suit la logique du repressilator. Supposons que le condensateur C_2 se charge à travers la résistance R_2 , lorsque la tension V_2 atteint la tension de seuil V_{th} du transistor $T3$ celui-ci commence à conduire et son impédance de sortie est très basse. En conséquence la tension de sortie V_3 chute, dans ce cas la tension V_2 réprime « l'expression » de V_3 . Lorsque V_3 chute et descend sous la tension de seuil V_{th} le transistor T_1 se bloque et la tension V_1 augmente, ce qui à son tour bloque la tension V_2 et le processus se répète de forme circulaire. Les interactions sont similaires au réseau biochimique du repressilator. Les oscillations des trois tensions sont présentées dans la Fig. 2, l'alternance des trois tensions V_1, V_2 et V_3 s'observe très bien. Nous avons un déphasage de $2\pi/3$ entre chaque tension. Quand le transistor T_1 est actif le second est bloqué et le troisième est actif. Ce type d'oscillateur est connu en électronique sous le nom d'oscillateur en anneau (« ring oscillator ») et est présent dans de nombreux dispositifs électroniques. Les équations différentielles modélisant le circuit peuvent s'écrire de la forme

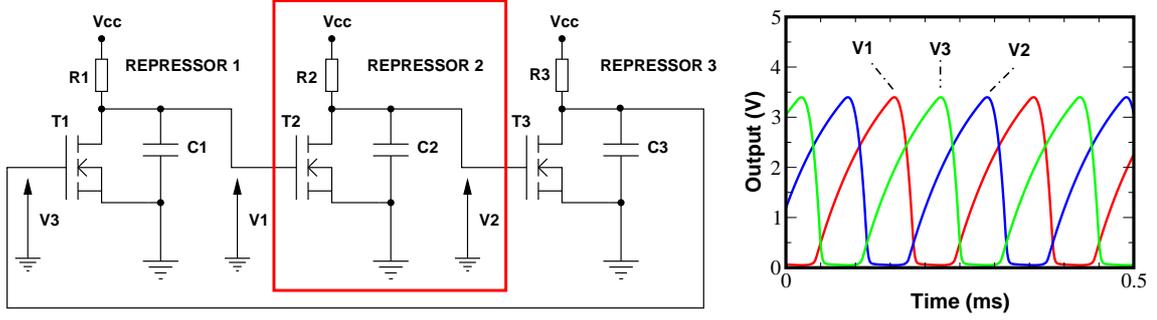


Fig.2. Schéma du circuit électronique simulant la dynamique du repressilator. Les paramètres du circuit sont $C_i = 1\mu\text{F}$, $R_i = 1k\Omega$, $V_{cc} = 3.5\text{V}$ et 2N7000 MOSFET. A droite nous représentons l'évolution temporelle des tensions du circuit.

suivante :

$$R_1 C_1 \frac{dV_1}{dt} = -V_1 + V_{cc} f(V_3) \quad (1)$$

$$R_2 C_2 \frac{dV_2}{dt} = -V_2 + V_{cc} f(V_1) \quad (2)$$

$$R_3 C_3 \frac{dV_3}{dt} = -V_3 + V_{cc} f(V_2). \quad (3)$$

La fonction f est une fonction non-linéaire représentant la fonction de transfert du transistor. Cette fonction sigmoïdale peut s'exprimer :

$$f(x) = \frac{\alpha}{1 + \beta x^n}, \quad (4)$$

avec α , β et n des constantes dépendantes du modèle de MOSFET choisi.

4 La synchronisation des repressilators

Une fois que nous avons simulé expérimentalement un seul repressilator nous nous intéressons maintenant au problème de la synchronisation d'un ensemble d'oscillateurs. Les expériences réalisées en laboratoire ont montré que les oscillations cohérentes sont perdues rapidement, chaque repressilator est déphasé et oscille à une fréquence différente. Un mécanisme de communication inter-cellulaire appelé le quorum-sensing a été proposé afin d'obtenir une synchronisation globale du système [2]. Une molécule est échangé à travers le milieu par les bactéries, c'est l'auto-inducteur. La quantité de molécule commune émise est inversement proportionnelle à une des protéines du repressilator. A son tour cette molécule agit sur le réseau en réprimant un des gènes du repressilator. Ce principe permet un couplage global du système. Dans notre modèle électronique un tel couplage est très simple à réaliser, il s'agit simplement de choisir une des tensions du repressilator et de l'unir aux autres oscillateurs à un point commun via une résistance. Le principe de la synchronisation est décrit dans le panneau droit de la Fig. 3. La contribution de tous les repressilators est sommé et réinjecté dans le circuit. Le panneau gauche de la Fig. 3 résume les résultats obtenus avec 16 repressilators. Les paramètres internes de chaque repressilator ont été légèrement modifié afin d'avoir une distribution des fréquences variant de 10% autour de la moyenne. Le couplage est réalisé à l'aide de la résistance R_c comme indiqué dans le schéma de la Fig. 3. La synchronie du système est mesuré à l'aide d'une mesure de la cohérence R :

$$R = \frac{\langle \overline{V_{1,i}^2} \rangle - \langle \overline{V_{1,i}} \rangle^2}{\langle V_{1,i}^2 \rangle - \langle V_{1,i} \rangle^2}, \quad (5)$$

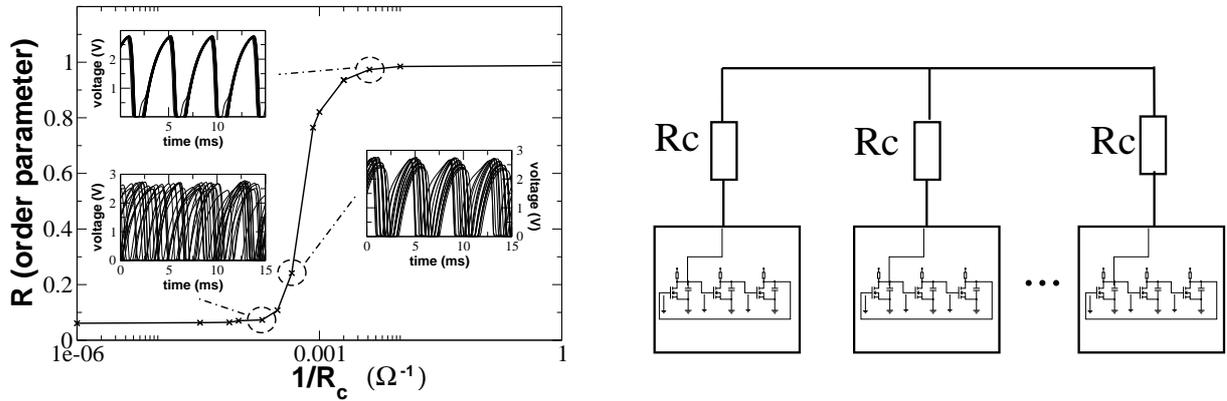


Fig.3. A gauche, paramètre d'ordre R représentant la synchronisation du système de $n = 16$ repressilators en fonction de la résistance de couplage R_c . Le système est complètement synchronisé lorsque $R \sim 1$. Sur le même graphique nous avons représenté les séries temporelles correspondantes à trois valeurs de la résistance R_c . A droite nous présentons un schéma du couplage des circuit.

où $\langle \cdot \rangle$ représente la moyenne temporelle et $\overline{\cdot}$ représente la moyenne sur la population de repressilators et $V_{1,i}$ correspond à la première tension du repressilator i . Quand ce paramètre s'approche de 1 la population est synchronisé. Dans la Fig. 3 la synchronisation s'améliore lorsque le paramètre de couplage $1/R_c$ est augmenté (la synchronisation augmente lorsque la résistance diminue). La transition vers la synchronisation se fait brusquement, nous obtenons une transition de phase typique des oscillateurs couplés.

5 Le commutateur génétique

En suivant la même démarche que pour le repressilator, nous obtenons un système bistable similaire au « toggle switch » développé par Gardner *et al.* [3]. C'est un réseau de deux gènes mutuellement represser, le schéma du réseau est décrit dans la Fig. 4. Lorsque l'un des deux represser domine l'autre est réduit au silence.

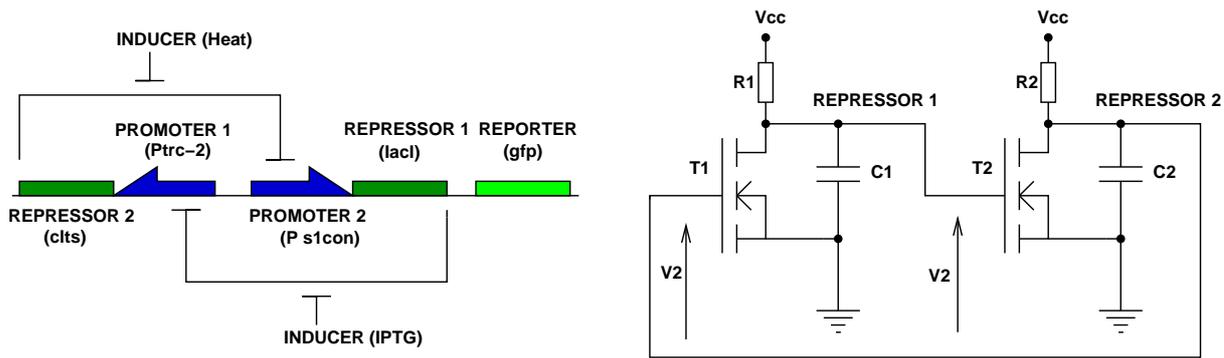


Fig.4. Dans la figure a, nous représentons le schéma logique du toggle-switch publié par Gardner *et al.*. La figure b représente le schéma électronique du toggle-switch conçu avec deux transistors.

L'implémentation électronique est très similaire à la précédente, il s'agit de deux transistors couplés de manière à ce qu'un transistor réprime l'autre. Nous présentons dans la Fig. 4 le réseau génétique accompagné du circuit électronique implémentant ce modèle. L'état du réseau biochimique peut être basculé

en appliquant un changement de température ou un produit chimique agissant sur une des protéines. Pour changer l'état du circuit électronique il suffit de donner une brève impulsion à un des transistor (par exemple en le connectant à la masse) pour que l'autre transistor prenne l'avantage. Les équations différentielles correspondant au circuit de la Fig. 4 sont :

$$R_1 C_1 \frac{dV_1}{dt} = -V_1 + V_{cc} f(V_2) \quad (6)$$

$$R_2 C_2 \frac{dV_2}{dt} = -V_2 + V_{cc} f(V_1) \quad (7)$$

où f est la même fonction que dans l'équation 4. La représentation de l'espace des phases du système se trouve dans la Fig. 5. Il se compose de trois points fixes, deux stables et un instable. Nous traçons aussi la séparatrice démarquant la limite des deux bassins d'attraction. La dynamique lors d'une commutation est identique à une décharge de condensateur, c'est un système du premier ordre.

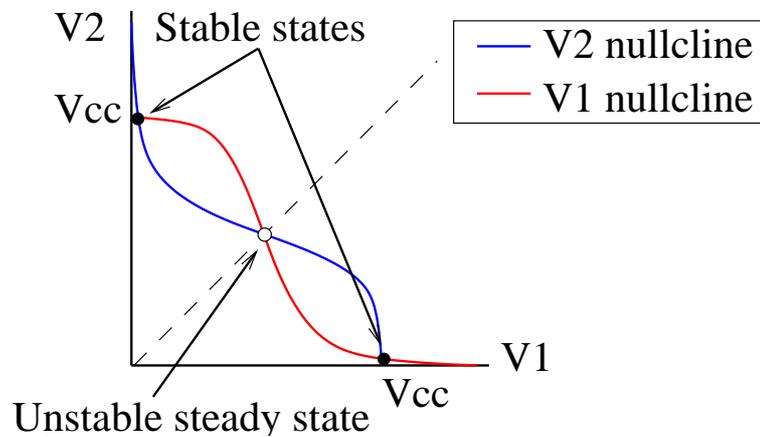


Fig.5. Espace des phases de l'équation (6) et (7), nous observons deux états stable et un état instable, la première diagonale représente la séparatrice des deux bassins d'attraction.

6 Conclusions

Nonobstant leur simplicité, les circuits reproduisent les comportements dynamiques des réseaux de régulation génétiques présentés. La simplicité de ces circuits et leur performance en temps de calcul permet d'envisager des réseaux de plus grande échelle. De plus les circuits électroniques contiennent un bruit intrinsèque et des tolérances sur les composants qui les rapprochent du système biologique originel. L'introduction de delay dans les boucles de retour permettent une simulation plus proche des interactions génétiques dans la cellule.

Remerciements

Nous remercions le soutien financier du Ministère des Sciences et Technologie de l'Espagne, projet BFM2003-03081(AW et MAFS) et BFM2003-07850(JMB et JGO), et de la Generalitat de Catalunya.

Références

1. M.B. ELOWITZ ET S. LEIBLER, A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators, *Nature*, **403**, 335-338 (2000).

2. J. GARCÍA-OJALVO, M.B. ELOWITZ ET S. STROGATZ, Modeling a synthetic multicellular clock : Repressors coupled by quorum sensing, *Proc. Nac. Acad. Sci. USA*, **101**, 10955-10960 (2004).
3. T.S. GARDNER, C.R. CANTOR ET J.J. COLLINS, Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli, *Nature*, **403**, 339-342 (2000).
4. J. HASTY, D. McMILLEN, ET J.J. COLLINS, Engineered gene circuits, *Nature*, **420**, 224 (2002).
5. J. MASON, P.S. LINSAY, J.J. COLLINS ET L. GLASS, Evolving complex dynamics in electronic models of genetic networks, *Chaos*, **14**, 707-715 (2004).
6. P. FRANÇOIS, (2005), *Réseaux génétiques : conception, modélisation et dynamique*, thèse de doctorat de l'université Paris VII. (2005).
7. P. FRANÇOIS ET V. HAKIM, Design of genetic network with specified functions by evolution *in silico*, *Proc. Nac. Acad. Sci. USA*, **101**, 580-585 (2004).
8. A. WAGEMAKERS , J. M. BULDÚ, J. GARCÍA-OJALVO ET M. A. F. SANJUÁN, Synchronization of electronic genetic networks, *Chaos*, 16(01xxxx), (2006)
9. J. M. BULDÚ, A. WAGEMAKERS, M. A. F. SANJUÁN ET J. GARCÍA-OJALVO, Electronic design of synthetic genetic networks, *Int. J. Bifurcation and Chaos*, 16(xxx) (2006).