

Synthèse de circuits génétiques autoréglés

Les biologistes ont depuis longtemps réalisé l'importance biologique des « circuits de régulation », ou « boucles de rétroaction », c'est-à-dire des séquences circulaires d'interactions [1]. En particulier, les circuits auto-activateurs ont souvent été associés à l'existence de patrons d'expression génétique alternatifs [2, 3]. Déjà, vers la fin des années 1970, René Thomas proposa une distinction rigoureuse entre deux classes de circuits selon que, au sein d'un circuit donné, tous les éléments se contrôlent les uns les autres indirectement (ou directement dans le cas particulier d'un circuit à un élément) de façon positive ou négative [4-7]. Pour distinguer entre ces deux classes de circuits, il suffit de compter le nombre d'interactions négatives; si ce nombre est pair, on a affaire à un circuit positif; s'il est impair, on a affaire à un circuit négatif (comme dans le cas du calcul du signe d'un produit de nombres réels). Ces deux classes de circuits sont à la base de propriétés biologiques très différentes: les circuits positifs permettent en effet la coexistence d'états d'expression multiples, tandis que les circuits négatifs permettent une expression homéostatique des différents gènes impliqués (Tableau I).

Depuis, des progrès substantiels ont été obtenus dans le cadre de l'analyse des mécanismes moléculaires à la base de la régulation de l'expression génétique et des processus de différenciation [8-10]. En parallèle, des études formelles ont permis de clarifier les rôles dynamiques des circuits positifs et négatifs [11-13]. En effet, plusieurs auteurs ont pu démontrer qu'un système de régulation, modélisé en termes d'équations différentielles, doit comporter au moins un circuit positif pour avoir un comportement multistationnaire, et au

moins un circuit négatif pour présenter des oscillations entretenues.

Plus récemment, la notion de circuit de régulation s'est révélée particulièrement utile pour décomposer les réseaux de régulation complexes en modules fonctionnels, définis comme des combinaisons de circuits entremêlés (c'est-à-dire des circuits qui partagent des éléments les uns avec les autres), pour ensuite prédire leurs propriétés dynamiques [14]. Les circuits de régulation constituent en quelque sorte des composants dynamiques élémentaires qui, combinés, provoquent des comportements dynamiques complexes.

La plupart des études antérieures sont fondées sur l'analyse de systèmes biologiques naturels et visent essentiellement à une compréhension plus profonde du lien entre la structure régulatrice et les propriétés dynamiques correspondantes, c'est-à-dire le patron d'expression spatio-temporel des gènes impliqués [15-17]. Déjà, vers la fin des années 1980, les connaissances accumulées sur les propriétés dynamiques des circuits de régulation élémentaires conduisirent René Thomas à concevoir des circuits de régulation (positifs et négatifs) synthétiques, en combinant des opérateurs, promoteurs et gènes de régulation provenant du bactériophage lambda, à l'aide des outils du génie génétique disponibles à l'époque [5]. Malheureusement, divers problèmes techniques conduisirent à l'abandon de ce projet après quelques années.

Plus récemment, plusieurs groupes se sont attelés à la construction de tels circuits de régulation élémentaires en utilisant des promoteurs, opérateurs et gènes de régulation provenant de la bactérie *Escherichia coli*. Ces travaux viennent de déboucher sur la publication de trois articles dans la revue *Nature* [18-20]. De manière révélatrice, ces trois articles combinent chacun une étude expérimentale avec l'analyse d'un modèle théorique formalisé en termes d'équations différentielles. Dans les trois cas, l'accent est mis sur les propriétés génériques du circuit de régulation considéré plutôt que sur la détermination de détails tels que l'estimation précise de valeurs paramétriques.

L'article de Gardner *et al.* est le seul qui traite de la construction d'un circuit positif, par conséquent susceptible de produire des états d'expression multiples (multistationnarité) [18]. Cet « interrupteur » génétique est constitué de deux promoteurs répressibles, contrôlant l'expression des répresseurs correspondants de manière croisée (figure 1, colonne de gauche). D'après les auteurs, ce schéma minimise le nombre d'éléments (opérateurs, promoteurs et gènes) nécessaires pour obtenir un « interrupteur » robuste et stable. En l'absence d'inducteur, un seul répresseur est normalement synthétisé, et nous avons donc, en fonction du répresseur exprimé, deux états d'expression relativement stables par rapport aux fluctuations inhérentes aux mécanismes de l'expression

Tableau I. Définitions et propriétés des circuits de régulation positifs et négatifs.

	Circuits positifs	Circuits négatifs
Nombre d'interactions négatives	Pair	Impair
Propriété dynamique	Multistationnarité	Homéostasie
Rôle biologique	Différenciation	Expression homéostatique

	Construction de Gardner <i>et al.</i>	Construction de Elowitz et Leibler	Construction de Becskei et Serrano
Construction			
Schéma logique			
Propriétés	<ul style="list-style-type: none"> • Expression stable et exclusive de l'un ou l'autre des deux répresseurs • Mémoire de l'induction de l'un de ces deux répresseurs • Stabilité et robustesse face aux fluctuations biochimiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression cyclique des répresseurs • Transmission du comportement oscillant à travers les générations de bactéries 	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité accrue et variabilité diminuée de l'expression du répresseur • Compensation des effets de dosage du gène.

Figure 1. **Synthèse et propriétés de trois circuits génétiques autorégulés.** La construction de Gardner *et al.* (colonne de gauche) forme un circuit positif comportant deux interactions négatives croisées. Le répresseur R1 est sous le contrôle du promoteur P2 à partir duquel la transcription est inhibée par le répresseur R2. Le répresseur R1 inhibe à son tour l'activité du promoteur P1 qui contrôle la transcription du répresseur R2 et du gène codant pour la GFP (green fluorescent protein), utilisé comme rapporteur. Le répresseur R1 exerce donc un effet indirect positif sur sa propre expression en inhibant l'expression de R2 qui, s'il était exprimé inhiberait l'expression de R1. Ce schéma aboutit donc à l'expression stable de l'un ou l'autre des deux répresseurs. L'ajout d'un inducteur diminuant l'affinité de l'un ou l'autre des répresseurs pour les sites opérateurs correspondants peut faire basculer le système d'un état d'expression à l'autre. La construction d'Elowitz et Leibler (colonne du milieu) constitue un circuit négatif composé de trois interactions négatives. Le répresseur R1 inhibe l'expression du répresseur R3 qui inhibe l'expression de R2 qui inhibe à son tour l'expression de R1. Un deuxième plasmide exprime, sous le contrôle de R1, un variant instable de la GFP utilisé comme gène rapporteur. Ce système aboutit à une expression cyclique des répresseurs, ainsi que de la GFP. La construction de Becskei et Serrano (colonne de droite) est un circuit négatif formé d'une seule interaction négative, l'expression du répresseur R1 inhibant l'activité de son propre promoteur. Ce circuit permet de limiter les fluctuations de l'expression des gènes R1 et GFP, ainsi que de compenser les effets de dosage de gène résultant de la variation du nombre de copies du plasmide.

génique. Néanmoins, le système peut basculer d'un état à l'autre quand apparaît une perturbation majeure de l'activité répressive, par exemple une induction chimique ou thermique transitoire qui va provoquer

une baisse drastique d'affinité du répresseur pour les sites opérateurs correspondants. Ces propriétés ne dépendent pas de la nature exacte des couples répresseurs/opérateurs utilisés. Toutefois, certaines condi-

tions doivent être respectées pour obtenir un interrupteur fonctionnel : d'une part, un degré de coopérativité minimum pour les mécanismes répressifs est nécessaire (par exemple *via* l'existence de plusieurs sites opérateurs sur lesquels le répresseur se lierait de manière coopérative) ; d'autre part, l'interrupteur ne fonctionne correctement que pour une certaine gamme de valeurs des taux de synthèse et de dégradation des deux répresseurs. Lorsque ces conditions sont rencontrées, on obtient un interrupteur qui fonctionne comme une unité de mémorisation. D'un point de vue théorique, ces conditions correspondent à la nécessité d'une non-linéarité suffisante (les effets coopératifs étant représentés par des termes exponentiels dans les équations différentielles), ainsi que de paramètres cinétiques adéquats pour avoir un comportement bistable. Ces conditions s'ajoutent, bien entendu, à la nécessité primordiale d'une structure régulatrice adéquate (circuit positif).

Les deux autres articles décrivent la synthèse de circuits négatifs [19, 20]. Le premier circuit, réalisé par Elowitz et Leibler, est constitué par l'enchaînement de trois régulations négatives (figure 1, colonne du milieu) [19]. Une seconde construction comporte un gène rapporteur contrôlé par l'un de ces répresseurs. L'objectif est ici la réalisation d'un oscillateur, susceptible de conduire à une expression périodique (avec décalage de phase) des trois répresseurs. La conception de ce « répressillateur » repose sur une analyse théorique des conditions nécessaires pour créer des oscillations entretenues dans le cadre de la théorie des systèmes dynamiques (équations différentielles ordinaires). En effet, en l'absence de délais suffisants, il faut enchaîner au minimum trois éléments pour obtenir un comportement oscillant entretenu à partir d'une boucle négative simple [5-7]. De plus, des conditions comme la présence d'au moins une non-linéarité suffisante (coopérativité), ainsi que des conditions sur les relations entre paramètres cinétiques (demi-vie et niveau de concentration maximum des régulateurs) doivent aussi être respectées.

La construction d'Elowitz et Leibler provoque une expression oscillante du gène rapporteur avec une période de l'ordre de 2h30, plusieurs fois la durée typique du cycle cellulaire de la bactérie (en phase de croissance exponentielle). Cela signifie donc que l'état d'expression oscillant est transmis de génération en génération, malgré le bruit important lié aux changements d'expression considérables qui ont lieu au cours du cycle cellulaire. Le comportement observé est donc robuste, même si des conditions de synchronisation sont nécessaires pour observer les oscillations au niveau de la population de bactérie.

Dans leur conclusion, les auteurs insistent tout particulièrement sur l'utilité de telles constructions pour comprendre les principes sous-jacents à la structure des réseaux biologiques naturels, ainsi que leurs propriétés génériques en particulier leur robustesse.

Dans le troisième article, Becskei et Serrano analysent les propriétés d'un simple circuit auto-inhibiteur (*figure 1*, colonne de droite) [20]. Celui-ci est constitué d'un promoteur sensible au répresseur de l'opéron tétracycline du transposon Tn10 (TetR) qui dirige l'expression du répresseur lui-même et d'un variant instable de la protéine fluorescente verte (GFP) servant de gène rapporteur. L'expression de cette protéine fusionnée est comparée à celle contrôlée par un répresseur ou des opérateurs hétérologues (éléments de l'opéron *lac*). Pour une expression moyenne identique, l'expression de la protéine fusionnée varie moins et se révèle plus stable vis-à-vis de perturbations pour la construction qui intègre une autorégulation comparée aux témoins. L'auto-inhibition confère donc au gène régulateur le pouvoir de neutraliser, au moins en partie, les fluctuations inhérentes à l'expression génique. D'autre part, la comparaison entre des constructions similaires intégrées dans des plasmides à bas, moyen, et haut nombre de copies révèle que l'augmentation de l'expression du gène est nettement plus faible que celle du nombre de copies. L'auto-régulation négative compense donc dans une large

mesure le dosage en nombre de copies de la construction génétique. Fréquemment rencontrées dans le cas des gènes impliqués dans la régulation de la transcription chez les procaryotes, de telles autorégulations négatives ont déjà été associées par plusieurs auteurs à des propriétés homéostatiques, et ce souvent en référence à des études théoriques [5, 21, 22]. Des effets de compensation de dosage du nombre de copies d'un gène avaient même été prédits sur la base d'une analyse théorique du système de régulation du bactériophage lambda [5, 6]. Les hypothèses de ces auteurs trouvent donc enfin une confirmation expérimentale claire dans les résultats publiés par Becskei et Serrano.

Ensemble, ces trois articles ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de l'analyse des systèmes de régulation génétique. En effet, la synthèse de circuits autorégulateurs, et peut-être bientôt de réseaux de régulation plus complexes, permet tout d'abord de vérifier et éventuellement d'affiner notre compréhension des mécanismes de régulation génétiques. En choisissant bien les éléments utilisés, il est en plus possible de réaliser des constructions génétiques dont l'expression est contrôlée de manière largement indépendante des aléas de la physiologie de la bactérie hôte.

D'un point de vue théorique, une analyse comparative des différentes constructions déjà réalisées suggère trois types de contraintes à prendre en considération pour obtenir les propriétés dynamiques désirées: (1) une structure logique adéquate (c'est-à-dire, pour les trois cas considérés plus haut, une séquence d'interactions formant un circuit de régulation de signe approprié); (2) des effets coopératifs (à la base d'une non-linéarité suffisante); (3) des taux de synthèse et de dégradation compatibles avec le fonctionnement dynamique du circuit de régulation. Dans un futur proche, un meilleur contrôle de ces paramètres et l'addition de mécanismes d'enclenchement, de déclenchement ou de synchronisation appropriés (par exemple en utilisant des régulateurs thermosensibles), devraient conduire

à la synthèse de circuits dotés de propriétés d'expression précises, comme par exemple une expression exactement circadienne. A plus long terme, la combinaison de plusieurs circuits devrait même permettre la construction de modules régulateurs dotés de propriétés d'expression spatio-temporelle plus complexes.

Quand leur maîtrise sera plus parfaite, la conception et la réalisation de modules autonomes parce que soumis à une autorégulation pourront trouver de nombreuses applications dans le domaine biomédical, ainsi qu'en ingénierie agronomique. A titre d'exemple, un module régulateur finement paramétré pourrait contrôler la synthèse *in vivo* de l'une ou l'autre protéine (comme l'insuline) uniquement lorsque le besoin s'en fait sentir, c'est-à-dire lorsque des conditions cellulaires précises sont rencontrées (en cas de concentrations trop élevées de glucose).

RÉFÉRENCES

1. Monod J, Jacob F. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1961; 26: 389-401.
2. Lewis J, Slack J, Wolpert L. Thresholds in development. *J Theor Biol* 1977; 65: 1633-48.
3. Meinhardt H. Space-dependent cell determination under the control of morphogen gradient. *J Theor Biol* 1978; 74: 307-21.
4. Thomas R. Logical analysis of systems comprising feedback loops. *J Theor Biol* 1978; 73: 631-56.
5. Thomas R, D'Ari R. *Biological feedback*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990.
6. Thomas R, Thieffry D. Les boucles de rétroaction, rouages des réseaux de régulation biologiques. *Med Sci* 1995; 11: 189-97.
7. Thomas R, Thieffry D, Kaufman M. Dynamical behaviour of biological regulatory networks. I. Biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state. *Bull Math Biol* 1995; 57: 247-76.
8. Lawrence PA. *The making of a fly*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992.
9. Ptashne M. *A genetic switch: phage λ and higher organisms*. Cambridge, MA: Cambridge University Press, 1992.
10. Arnone MI, Davidson EH. The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 1997; 124: 1851-64.

RÉFÉRENCES

11. Plahte E, Mestl T, Omholt SW. Feedback loops, stability and multistationarity in dynamical systems. *J Biol Syst* 1995; 3: 409-13.
12. Gouzé JL. Positive and negative circuits in dynamical systems. *J Biol Syst* 1998; 6: 11-5.
13. Snoussi EH. Necessary conditions for multistationarity and stable periodicity. *J Biol Syst* 1998; 6: 3-9.
14. Mendoza L, Thieffry D, Alvarez-Buylla ER. Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics* 1999; 15: 593-606.
15. Arkin A, Ross J, McAdams HH. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage λ -infected *Escherichia coli* cells. *Genetics* 1998; 149: 1633-48.
16. Reinitz R, Kosman D, Vanario-Alonso CE, Sharp D. Stripe forming architecture of the gap gene system. *Dev Genet* 1998; 23: 11-27.
17. von Dassow G, Meir E, Munro EM, Odell GM. The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 2000; 406: 188-92.
18. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 2000; 403: 339-42.
19. Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 2000; 403: 335-8.
20. Becskei A, Serrano L. Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* 2000; 405: 590-3.
21. Hlavacek WS, Savageau MA. Rules for coupled expression of regulator and effector genes in inducible circuits. *J Mol Biol* 1996; 255: 121-39.
22. Thieffry D, Huerta A, Pérez-Rueda E, Collado-Vides J. From specific gene regulation to global regulatory networks: a characterisation of *Escherichia coli* transcriptional network. *BioEssays* 1998; 20: 433-40.
23. Thomas R. Regulatory networks seen as asynchronous automata: a logical description. *J Theor Biol* 1991; 153: 1-23.
24. Thomas R, Thieffry D, Kaufman M. Dynamical behaviour of biological regulatory networks. I. Biological role and logical analysis of feedback loops. *Bull Math Biol* 1995; 57: 247-76.

Denis Thieffry

École supérieure d'ingénieurs de Luminy,
Université de la Méditerranée, Campus de
Luminy, Case 925, 13288 Marseille
Cedex 09, France.

TIRÉS À PART

D. Thieffry.

* GLOSSAIRE *

Types de régulation : la régulation homéostatique d'une variable la stabilise (avec ou sans oscillations) entre le niveau plancher et le niveau plafond ; elle est liée à la présence d'une boucle de rétroaction négative. La régulation différenciative d'une variable l'oblige à un choix stable entre deux niveaux d'expression bien distincts ; elle est liée à la présence d'un circuit de rétroaction positive. C'est le cas des différences épigénétiques (c'est-à-dire transmissibles à travers les générations cellulaires malgré l'absence de différences dans le patrimoine génétique), y compris celles qui interviennent dans la différenciation des organismes multicellulaires.

Multistationnarité : capacité de certains système d'exister dans l'un ou l'autre de plusieurs états de régime. Pour qu'un système puisse avoir le choix entre de nombreux états stationnaires (cas des types cellulaires d'un organisme supérieur), il faut plusieurs circuits de rétroaction positive, en d'autres termes, un nombre modéré de gènes sujets à autorégulation positive directe ou indirecte. Le passage d'un état stationnaire à un autre requiert en général une perturbation majeure. Un exemple est donné par l'infection bactérienne par un phage, où il y a un choix entre deux réponses, celle qui mène à la lyse bactérienne, alors que l'autre entraîne la perpétuation sous forme de bactérie lysogène. Un second exemple est celui du système immunitaire qui peut exister dans trois états, vierge, immun et tolérant.

Non-linéarité : l'analyse de systèmes biologiques comportant des boucles de rétroaction enchevêtrées nécessite une formalisation. Celle-ci peut se faire sous forme d'équations différentielles, mais cette approche est souvent difficile à appliquer du fait du caractère non linéaire des interactions qui, en biologie, prennent généralement une forme sigmoïde. En effet, un régulateur est souvent sans action en dessous d'une valeur seuil, et son effet croît rapidement au voisinage de cette valeur pour plafonner bientôt. Il peut aussi avoir plusieurs sites d'action sur lesquels il peut agir de façon différente ou coopérative. Pour étudier le comportement de tels systèmes, on peut faire appel à une analyse logique qui permet de « démêler » le système complexe, en remplaçant les sigmoïdes par des fonctions en « escalier » (régulateur présent ou absent) et en attribuant une valeur logique à chaque marche (ou seuil). Décrite dans [23, 24], cette approche a été appliquée dans plusieurs autres disciplines (climatologie, politologie, prise de décision...).

