Journal de la Société de Biologie, 193 (4), 401-410 (1999)

La gestion du temps par la cellule et par l'organisme

par L. Robert

Laboratoire de Recherche en Ophtalmologie, Escalier B3, 6e étage, Hôtel-Dieu, 1, place du Parvis Notre-Dame, 75181 Paris cedex 04 et Centre de Recherche Bioclinique sur le Vieillissement, Groupe Hospitalier Charles Foix-Jean Rostand, 7, avenue de la République, 94205 Ivry sur Seine.

Reçu le 11 octobre 1999

RÉSUMÉ

La « gestion » du temps par la cellule et l'organisme peut être analysée à plusieurs niveaux. Le premier est l'étude des périodicités dans l'activité cellulaire, constatées à tous les niveaux d'étude (division cellulaire, métabolisme énergétique ou biosynthèse des constituants). L'étude de ces phénomènes chez les eucaryotes unicellulaires a révélé des périodicités correspondant à des constantes de temps s'échelonnant de la nanoseconde aux heures et jours nécessitant des mécanismes de couplage et de coordination. Qu'il s'agisse de la glycolyse, de la phosphorylation oxydative ou des processus de biosynthèse de macromolécules, des oscillations périodiques ont été enregistrées. La comparaison des constantes de temps de ces phénomènes suggère la subordination des périodes rapides (production d'ATP) aux périodes plus lentes (synthèse des constituants macromoléculaires). Le couplage entre ces deux types de phénomènes (« la danse lente de la vie à la musique du temps ») s'effectue au niveau du métabolisme des nucléotides adényliques. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces régulations rythmiques conduisent soit à des enzymes-clés allostériques des voies métaboliques (PFK pour la glycolyse) ou encore à des phénomènes de désensibilisation de récepteur par phosphorylation-déphosphorylation. L'analyse des phénomènes rythmiques au niveau de l'organisme est illustrée par les rythmes cardiaques et par les oscillations d'excitations neuronales. Les rythmes cardiaques à l'état normal sont de nature multifractale et obéissent aux lois du chaos déterministe. Les réseaux neuronaux, impliquant un nombre limité de neurones, peuvent automatiquement et spontanément engendrer des décharges rythmiques.

La décomposition des rythmes circadiens en rythmes élémentaires essentiellement épigénétiques a dû permettre une meilleure adaptation de la cellule aux variations de la durée du jour au cours de l'évolution. En effet la durée du jour s'est considérablement allongée depuis la séparation de la lune et de la terre, exigeant des mécanismes d'adaptation des cellules et organismes de plus en plus évolués.

SUMMARY Management of time by tissues and cells in the organism

Time-dependent regulations of cells and organisms can be analysed at different levels. One of these levels is the periodicity of cell functions such as cell division, metabolic processes (generation of ATP by glycolysis or oxidative mitochondrial processes) and the biosynthesis of cell constituents. Studies carried out on unicellular eukaryotes revealed the periodic, oscillatory nature of most of these processes. Time constants of these reactions vary from nanoseconds to hours-days, necessitating coupling mechanisms. Comparative studies revealed the coupling of the rapid processes (mitochondrial ATP generation) to the slower rhythms of the biosynthetic processes of macromolecules. Adenine nucleotides are involved in the coupling mechanisms between rapid and slow processes ("the slow dance of life to the music of time"). The mechanisms underlying these rhythmic processes involve either key allosteric regulatory enzymes (PFK for glycolysis) or "desensitization" of receptors by phosphorylation-dephosphorylation. At the organismic level the study of rhythmic processes is illustrated by the periodicity of heart beats, shown to exhibit multifractality, following apparently the formalism of deterministic chaos. Another example is the rhythmic oscillatory discharges of neuronal networks. The existence of subrhythmes mostly of epigenetic nature, facilitated probably the progressive adjustment of cells during evolution to the slow increase of day time since the separation of the moon from the earth. We analysed the mechanisms underlying the decline of these processes during aging. Loss of receptors or/and their uncoupling from their transmission pathway appear to be involved in most of these processes of decline. One conclusion of this review is the importance of epigenetic mechanisms both in the genesis and in the decline of these rythmic processes involved in time keeping by the cell.

INTRODUCTION

Le concept du temps en biologie

Le temps est le paramètre le plus difficile à définir, certainement le plus mystérieux parmi tous les paramètres physiques incontournables pour le biologiste dans son travail quotidien. On constate d'ailleurs souvent son élimination systématique des réflexions et descriptions de nombreux phénomènes biologiques et surtout biochimiques. Il devient inévitable de s'y référer lors de l'étude du développement mais aussi lors de celle du vieillissement. La biochimie classique l'a pratiquement éliminé au cours de l'étude des grandes voies métaboliques. En parcourant un grand nombre de publications de cette époque, on a l'impression que les voies de biosynthèse n'ont ni début, ni fin, elles paraissent intemporelles. La cinétique enzymatique est bien obligée de porter le temps en abscisse des courbes d'évolution de la concentration du substrat, mais il s'agit ici d'un temps virtuel. D'autant plus que le calcul des constantes cinétiques ne peut faire usage que des temps initiaux des réactions extrapolées au « temps zéro ». C'est probablement les observations chronobiologiques, aussi bien dans le règne végétal qu'animal qui ont réintroduit le temps réel, le temps vécu en tant que paramètre biologique important. Ces observations de périodicité ont leur source dans la nature et en particulier dans l'agriculture. Les saisons, les alternances de jour et de nuit sont autant « d'indicateurs de temps » à l'origine de ces observations. La confusion probablement ancestrale entre le temps cyclique et le temps qui s'écoule ressort déjà de l'utilisation d'un seul terme en France pour ces deux types d'événements. D'autres langues comme l'allemand et l'anglais utilisent deux termes distincts, zeit et wetter ou time et weather ce qui atteste à cet égard une avancée conceptuelle certaine.

Une autre difficulté conceptuelle a son origine dans la difficulté d'imaginer des intervalles de temps très courts et très longs. L'imagination de l'Homme a eu du mal à s'écarter des limites fixées par l'alternance des jours. C'est la durée de la vie humaine, durée limitée qui a dû représenter pendant longtemps l'horizon indépassable. Pendant des millénaires cette durée de vie (moyenne) a dû être courte. Rares étaient les personnes pouvant atteindre un âge avancé. Seul le jeune adulte était capable de se défendre contre les agressions nombreuses de l'environnement. La mortalité infantile a été très importante jusqu'au début du XXe siècle. Les maladies infantiles ont pris la relève des prédations des époques paléolithiques. Les vieillards étaient rares, même au cours des siècles de lumière quand, enfin, on a consenti à les accueillir dans les hospices. L'augmentation de l'espérance de vie moyenne est un phénomène récent. Son accélération depuis le début et surtout le milieu du XXe siècle a bouleversé d'ailleurs de nombreux domaines de la vie sociale ainsi que des préjugés biologiques et médicaux. Il est donc compréhensible que l'Homme ait ressenti des difficultés à imaginer des durées importantes comme par exemple l'ancienneté du monde. L'Ancien Testament l'a fixé pendant des millénaires à environ 6 000 ans, durée déjà considérable. Pour certains philosophes et dans la plupart des mythologies, ce problème a été résolu par l'élimination de la durée et l'attribution de l'éternité sans début ni fin au « monde » ou encore en postulant un éternel recommencement (pour un récit historique voir Richet, 1999).

Les durées actuellement admises ont émergé au début du XXe siècle à la suite de la convergence de la paléogéologie utilisant la radioactivité pour les datages et de la paléobiologie l'étude de l'évolution du vivant. L'ancienneté des strates géologiques a été soupçonnée grâce aux observations de la paléoconchyologie permettant de quantifier les espèces disparues par rapport aux espèces encore présentes (Lyell, 1864, 1866 ; Richet, 1999). La théorie de l'évolution des espèces a révélé l'existence d'une autre périodicité à l'échelle des temps géologiques : l'apparition et la disparition des espèces animales et végétales. Ce « temps de l'évolution » mérite cependant une étude spéciale (Tassy, 1998).

En biologie, le problème du temps se présente de multiples façons : le temps du développement, de la maturation, du vieillissement pour ne mentionner que les gros chapitres. Entre ces limites se trouve le temps de la reproduction, limité à un intervalle précis du cycle vital. Les temps de la cellule concernent son métabolisme, sa division, ses différentes fonctions, qu'il s'agisse d'un être unicellulaire ou pluricellulaire. Dans ce qui suit nous allons nous limiter à la discussion de la « mesure » du temps au cours de la vie des cellules eucaryotes uni- et pluricellulaires.

La multiplicité du temps dans la vie de la cellule

L'étude dans le temps de la vie cellulaire révèle tout d'abord une gamme très large des intervalles de temps qui en caractérise les étapes. La connaissance détaillée des événements moléculaires de la vie cellulaire, des régulations métaboliques, des processus de biosynthèse, de catalyse enzymatique, d'échange avec l'environnement, de la respiration, du catabolisme, d'ouverture et fermeture des canaux ioniques, a révélé une multitude de fréquences, des constantes de temps qui caractérisent ces processus élémentaires (Tableau I). L'idée s'impose donc de la nécessité d'une coordination de ces temps de réaction si différents qui varient de la nanoseconde (replie-

TABLEAU I. – Les temps de la cellule.

Fonction	Domaines de temps
Changement de conformation des macromolécules Échanges ioniques	Nanoseconde-secondes
Réaction enzymatiques métabolisme intermédiaire	Secondes-minutes
Biosynthèse des macromolécules	Minutes
Cycles cellulaires demi-vie des macromolécules	Heures-jours
Durée de vie (maximale)	Jours-décennies

ment des protéines, échanges ioniques) aux heures et jours (cycle cellulaire, demi-vie des protéines de structure). Au cours de l'évolution, les cellules ont développé des mécanismes de coordination de ces réactions multiples, ce qui leur permet d'assurer une fonction équilibrée au cours de leur existence, courte ou longue selon leur nature. Un cycle cellulaire rapide comme chez la grande majorité des procaryotes, simplifie cette tâche. La durée de vie plus longue et plus compliquée des eucaryotes la rend plus ardue. La différenciation cellulaire, au cours de la morphogenèse des êtres pluricellulaires, représente probablement la meilleure façon de résoudre ce problème. Un certain nombre de tâches assurées par la même cellule chez les unicellulaires, est pris en charge par différentes cellules différenciées chez les êtres pluricellulaires. C'est peut-être aussi l'une des origines des durées de vie très différentes des cellules différenciées des organismes pluricellulaires. Les globules rouges des vertébrés ont une durée de vie relativement courte (environ 30 jours) comme d'ailleurs les leucocytes neutrophiles (les PMN) contrairement à certains lymphocytes T et surtout à la plupart des neurones dont la durée de vie se compte en années et décennies.

Cette inégalité des durées de vie (ou de demi-vie, $t_{1/2}$) se retrouve aussi au niveau des macromolécules biologiques : leur demi-vie varie de quelques heures (≤ 24 h pour la fibronectine plasmatique par exemple) à des décennies (certaines protéines fibreuses de la matrice extracellulaire, par exemple l'élastine). Pour la gestion de ces intervalles et durées de réaction et de temps de renouvellement très différents, les cellules ont développé un grand nombre de mécanismes de régulation. Certains seulement de ces mécanismes peuvent être discutés dans le cadre de cette séance. La constatation primordiale qui a ouvert la voie à la compréhension de ces mécanismes ci-dessus évoqués est certainement la périodicité des phénomènes biologiques du niveau cellulaire jusqu'au niveau des organismes et même au niveau de la population et des espèces. Dans ce qui suit, nous évoquerons quelques observations qui ont permis de comprendre et de décrire ces mécanismes au niveau moléculaire et cellulaire. La dernière partie de cette revue sera consacrée à l'étude du déclin de ces fonctions périodiques qui caractérisent le vieillissement et la mort, de la cellule à l'individu.

La périodicité des phénomènes métaboliques

La glycolyse

Les séquences enzymatiques impliquées dans la glycolyse ont été élucidées au début du XXe siècle. Cette séquence de réactions, partant de simples glucides, souvent le glucose, produit de l'énergie, de l'ATP. Duysens et Amesz (1957) ont observé que cette réaction, chez la levure, procède par oscillations périodiques. Britton Chance et son équipe à Philadelphie ont saisi toute l'importance de cette observation. Grâce au raffinement des moyens de mesure et d'enregistrement des réactions métaboliques, ils ont étudié en détail ce phénomène périodique oscillant (pour une revue voir Goldbeter, 1990). Leur méthodologie leur a permis de confirmer la nature périodique de la glycolyse (Ghosh & Chance, 1964 ; Ghosh *et al.*, 1971 ; Chance *et al.*, 1967). Tous les intermédiaires métaboliques de la glycolyse oscillent avec la même fréquence, mais avec un décalage de phase (Fig. 1). La période de ces oscillations varie avec la concentration (vitesse d'injection) des métabolites et c'est la vitesse d'arrivée du substrat (le tréhalose en l'occurrence) qui en détermine la périodicité. Hess et Boiteux (1968a, b, 1973) ont montré que cette périodicité est maintenue même dans des extraits de levure donc en

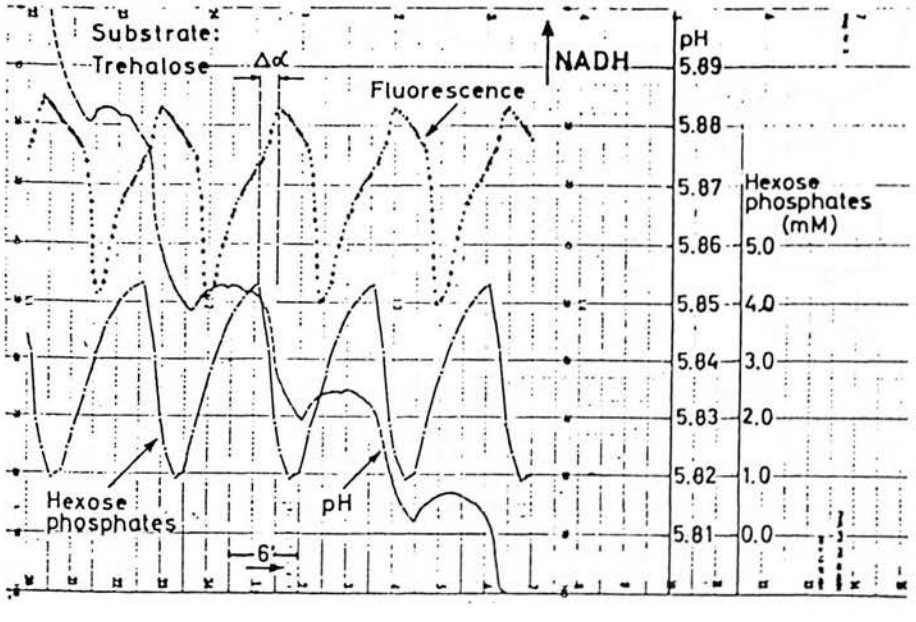

FIG. 1. – Oscillations glycolytiques dans un extrait de levure soumis à une injection constante de substrat. L'analyse chimique montre que les hexoses (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, fructose 1,6-biphosphate) oscillent à la même fréquence que NADH dont la fluorescence permet un enregistrement continu du phénomène (Hess, Boiteux & Krüger, 1969).

dehors de la cellule. Ceci a permis d'avancer des modèles d'explication, modèles qui ont pu être précisés à la suite de la découverte de la nature allostérique d'une enzyme-clef de la glycolyse, la phosphofructokinase (PFK). Ghosh et Chance (1964) ont montré que cette enzyme est activée par l'un des produits de sa réaction, l'ADP. Une telle activation d'une enzyme par son produit, rare en biochimie où les rétroinhibitions sont la règle, a permis à Goldbeter (1990) de proposer un modèle détaillé du contrôle de ce phénomène périodique. On trouve ici la clef d'autres régulations épigénétiques (voir plus loin) et de couplage des réactions métaboliques avec des phénomènes de biosynthèse par la sensibilité des enzymes-clefs aux nucléotides adényliques. Atkinson (1968) a défini le concept de la « charge d'adénylate », le rapport entre les différentes formes de ces nucléotides : (ATP) + 0,5 (ADP)/AMP + ADP + ATP. Selon ce concept, les enzymes produisant et utilisant l'ATP auraient une sensibilité inverse aux valeurs faibles ou élevées de ce rapport : les enzymes produisant l'ATP seraient inhibées aux valeurs élevées de cette charge, les enzymes qui le consomment seraient au contraire activées (Fig. 2). La PFK utilise l'ATP au cours de la réaction qu'elle catalyse mais en même temps la PFK fait partie d'une voie de biosynthèse produisant l'ATP (Goldbeter, 1990). Son activation par l'ADP (rétroaction positive) permet donc de proposer un schéma expliquant les oscillations glycolytiques observées dans des conditions précisées de fourniture du substrat (Fig. 2). La légende de la Figure 2 résume le modèle de régulation autocatalytique proposé par Hess & Boiteux (1968b) et Venieratos & Goldbeter (1979) pour les oscillations glycolytiques observées. Ce modèle a permis de l'expliciter sous la forme d'équations décrivant les étapes élémentaires de la catalyse, basées sur l'hypothèse d'une association préférentielle de l'ADP avec une forme allostérique « activée » des sous-unités de la PFK. Dans les extraits de levure agités continuellement, donc en milieu homogène, la diffusion, le temps du transport des métabolites est négligeable. Dans une suspension cellulaire, ce n'est plus le cas et la diffusion peut conduire à des structures dissipatives spatio-temporelles et par conséquence à des phénomènes d'autoorganisation. Chance *et al.* (1964, 1973) voulaient voir dans ce phénomène à périodicité de minutes (10-20 minutes à des heures selon les conditions) l'origine des rythmes circadiens, proches de 24 heures.

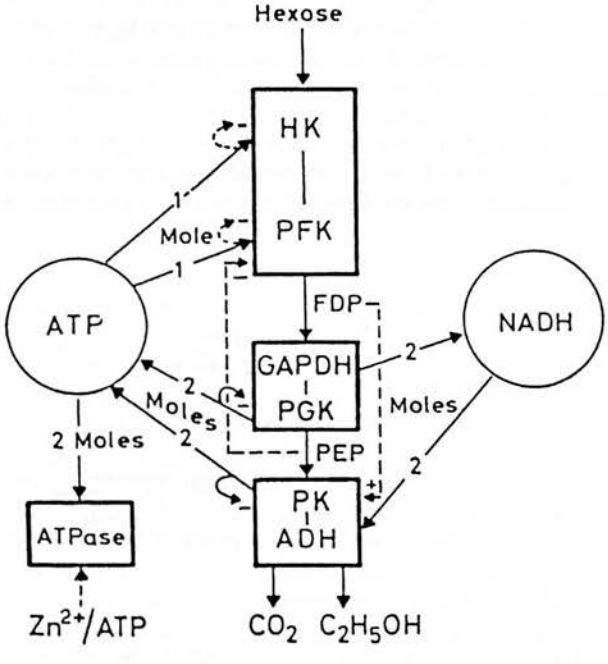

FIG. 2. – Schéma de contrôle du système glycolytique chez la levure. Les principales réactions enzymatiques sont indiquées verticalement, de l'hexokinase (HK) à l'alcool déshydrogénase (ADH), en passant par la phosphofructokinase (PFK), enzyme responsable des oscillations. Cette chaîne de réactions constitue la voie glycolytique dont la fonction est de produire de l'ATP lors de la transformation d'un hexose comme le glucose ou le fructose, en éthanol et CO_2. Les utilisations et productions d'ATP et de NADH, de même que certaines des principales régulations sont indiquées (Hess et Boiteux, 1968b).

Couplage entre métabolisme et cycle cellulaire

Parmi les phénomènes cycliques les plus étudiés, il y a en bonne place le cycle cellulaire. La prolifération cellulaire a été d'abord bien étudiée chez les procaryotes, les bactéries. Avec les progrès de la biologie moléculaire, certains auteurs ont cherché l'origine de phénomènes cycliques dans le fonctionnement de l'opéron (Painter & Tyson, 1984). Prenant comme modèle l'opéron qui régule la synthèse du tryptophane, ils ont mis en évidence une fonction cyclique par double rétroaction : celle du represseur de l'opéron sur l'élément régulateur de cette série de gènes, ainsi que la rétroinhibition par le tryptophane de l'anthranylate synthétase, la première enzyme de la chaîne. Cependant, la difficulté de mettre en évidence une synthèse pulsée de protéines dans un certain nombre de cellules a rendu difficilement défendable l'hypothèse originale. La découverte au cours des dernières années d'une série de gènes qui s'expriment tôt ou tardivement au cours du cycle cellulaire ainsi que du rôle prépondérant des étapes intermédiaires catalysées par des protéines kinases spécifiques régulées par des inhibiteurs et activateurs variant selon la nature des stimuli déclenchant le cycle (facteur de croissance, cytokines) a complètement changé l'aspect théorique et pratique du problème. La régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes reste néanmoins un problème central encore très partiellement compris de la biologie cellulaire (voir la revue de M. Morange dans ce volume).

Un autre aspect de ces couplages entre les processus métaboliques qui produisent de l'énergie et les processus de biosynthèse qui la consomment a été étudié en détail chez des eucaryotes unicellulaires par Lloyd & Edwards (1984). La préoccupation de ces auteurs a été la compréhension des mécanismes couplant la fourniture et la consommation d'énergie au cours du cycle cellulaire. Entre deux divisions, la cellule synthétise activement un grand nombre de ses constituants. Après la division cellulaire, ce processus recommence chez les cellules-filles.

En utilisant des cultures synchronisées *d'Acanthamoeba castellani*, Lloyd et Edwards sont arrivés à la conclusion que les oscillations épigénétiques déterminent les périodicités observées des variations du taux des métabolites de l'ATP (Fig. 3). Bien que les temps de réactions mitochondriales produisant l'énergie soient très rapides (de l'ordre de quelques secondes), les oscillations observées sont de deux ordres de grandeur plus longues. Ces auteurs en concluent que dans les systèmes intégrés que sont les cellules vivantes, le « chef d'orchestre » qui détermine les périodes des oscillations métaboliques sont les réactions biosynthétiques des protéines, de loin les plus exigeantes en énergie. Ils ont montré que ces synthèses oscillent aussi avec la même amplitude que la charge nucléotidique. L'amplitude de ces oscillations (54 %) est comparable à celle de la charge nucléotidique.

Il apparaît donc que le « chef d'orchestre » (activités biosynthétiques des protéines) impose son rythme plus lent aux « exécutants », les réactions mitochondriales (production oxydative de l'ATP).

Le couplage entre ces deux séries de phénomènes, production d'ATP et sa consommation lors des biosynthèses protidiques, serait assuré par les nucléotides adényliques : « la danse lente de la vie à la musique du temps » résulterait donc de la coordination de l'activité mitochondriale rapide à la demande d'énergie plus lente requise pour les synthèses protéiques (Fig. 5). Ceci implique aussi une oscillation de la synthèse des protéines comme ils ont pu le vérifier par l'enregistrement de l'activité et de la concentration de la catalase (Fig. 4), enzyme peroxysomale. Au cours d'un cycle cellulaire de 8 heures environ de l'amibe *A. castellani*, ils ont observé 7 maximums dans la production de l'enzyme. Des oscillations de même fréquence ont été observées pour d'autres enzymes aussi, comme l'ATP-ase et son inhibiteur, la cytochrome oxydase (Lloyd & Edwards, 1984). Selon ces auteurs, le nombre régulier et entier de ces oscillations épigénétiques (compensées pour les variations de température comme l'exige la chronobiologie) seraient les régulateurs du cycle cellulaire. Les cycles circadiens correspondraient donc à des multiples entiers de ces oscillateurs épigénétiques qui seraient les compte-tours de renouvellement cellulaire. Le fait bien établi aujourd'hui de l'allongement considérable du nombre d'heures par jour depuis l'éloignement de la lune de la terre rend plausible une telle hypothèse (Klevecz, 1984). La régulation des cycles sous-cellulaires telle qu'elle vient d'être esquissée a pu évoluer il y a environ 3,5 milliards d'années (Brocks *et al.*, 1999) d'après l'identification récente des premiers eucaryotes détectés

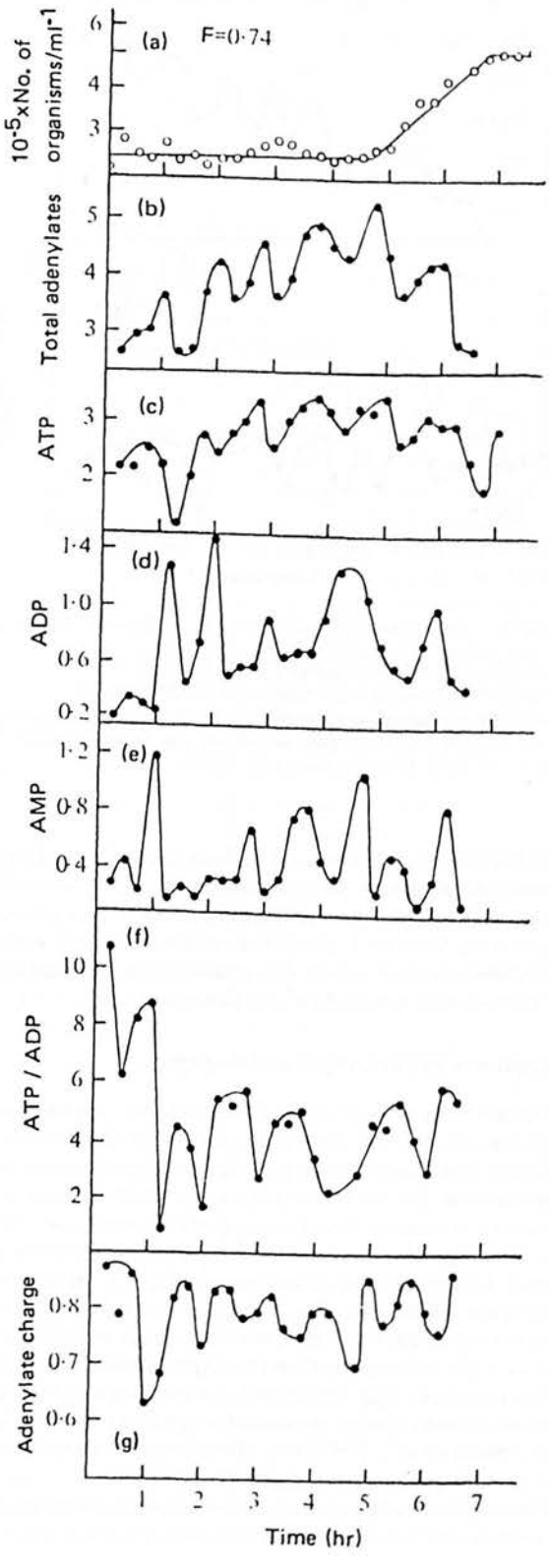

FIG. 3. – Oscillations périodiques des métabolites de l'adénosine triphosphate (ATP) dans une culture synchronisée de *A. castellani*.

(a) nombre de cellules et indice de synchronie ;
(b) adénylates totales ;
(c) adénosinetriphosphate, ATP ;
(d) adénosinediphosphate, ADP ;
(e) adénosine monophosphate, AMP ;
(f) rapport ATP/ADP ;
(g) charge adénylique.

Concentrations des adénylates en nanomoles par ml culture (d'après Lloyd et Edwards, 1984).

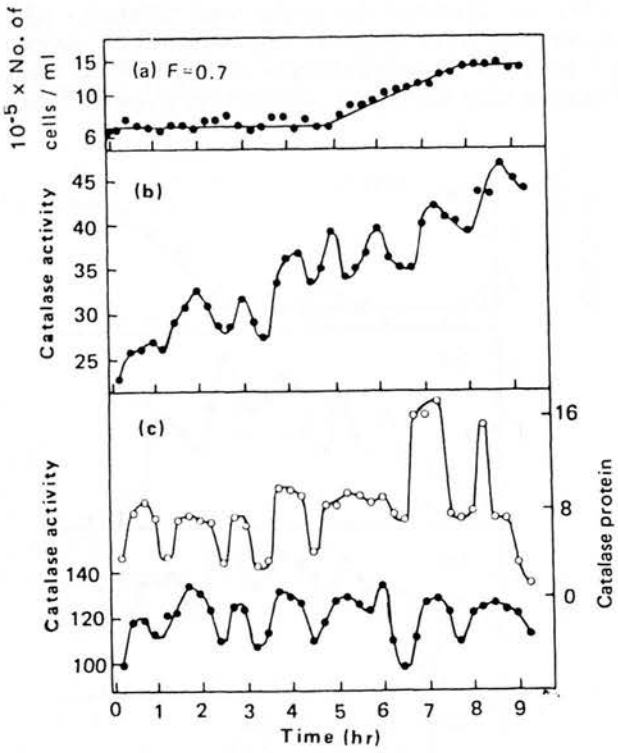

FIG. 4. – Oscillations périodiques de la synthèse de la catalase dans une culture synchronisée de *A. castellani*
(a) nombre de cellules et indice de synchronie ;
(b) activité catalasique, milli unités par ml de culture ;
(c) activité catalasique, milli unités par mg protéines (•~•) et catalase enzyme en mg protéines, déterminé par dosage immunologique o–o(d'après Lloyd et Edwards, 1984).

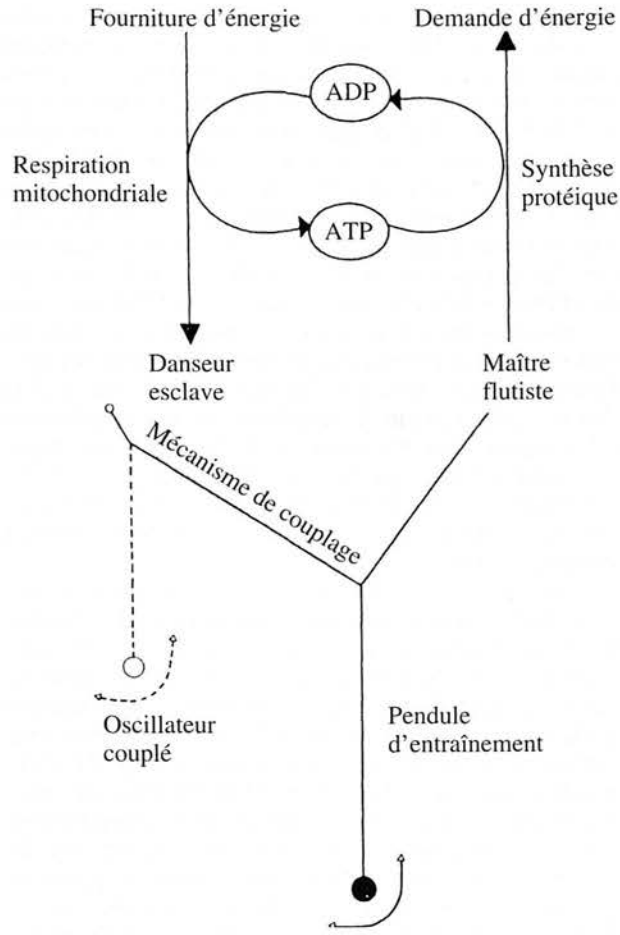

FIG. 5. – Demande et fourniture d'énergie comme oscillateurs couplés, la période du « maître-oscillateur » (synthèse protéique) détermine les fréquences de « l'oscillateur-esclave » (fourniture d'énergie) (d'après Lloyd et Edwards, 1984).

dans des roches d'Australie. L'allongement du cycle nycthéméral a dû exiger un ajustement approprié des fonctions cellulaires. Cette régulation quantique du cycle cellulaire a pu faciliter l'adaptation progressive par simple augmentation du nombre des sous-cycles métaboliques qui régissent la durée du cycle cellulaire.

Récepteurs et périodicités biologiques

Depuis l'avènement de l'endocrinologie, il a été généralement accepté que la sécrétion d'hormones préside à certaines fonctions périodiques de l'organisme comme la reproduction, les cycles ovariens, la nutrition ainsi qu'à certaines fonctions tissulaires périodiques, sécrétions digestives, rénales. Cette hypothèse exige cependant une nature cyclique de ces sécrétions ainsi que l'existence de récepteurs au niveau des cellules effectrices. Pour les organismes pluricellulaires, invertébrés et vertébrés, les connections nerveuses (noyau suprachiasmatique chez l'Homme) ainsi que des gènes à expression périodique (period, clock, cycle, doubletime chez la Drosophile, voir Zheng *et al.*, 1999) ont été invoqués, ce qui ne se peut pas chez les eucaryotes unicellulaires.

Par contre, l'interaction ligand-récepteur paraît jouer à ce niveau de l'évolution déjà un rôle régulateur du comportement périodique. Nous citerons le cas d'un Myomycète capable de passer de l'état unicellulaire à la vie associative car particulièrement bien étudiée par l'école bruxelloise. *Dictyostelium discoideum* prolifère à l'état unicellulaire jusqu'à l'épuisement des ressources nutritives. Ensuite les cellules s'agrègent en formant des sporanges par accumulation de spores à une des extrémités de la columelle, ce qui permet de recommencer le cycle. L'agrégation cellulaire forme des dessins concentriques réguliers, rappelant ceux produits par la réaction de Belousov-Zhabotinsky (pour une revue voir Goldbeter, 1990). Le signal chimiotactique émis par les cellules pour former les centres d'agrégation a été identifié à l'AMP-cyclique (AMPc). Des oscillations d'AMPc ont pu être observées dans des suspensions de ces cellules (Fig. 6). Ces oscillations correspondent à celles des formes phosphorylées et déphosphorylées du récepteur d'AMPc. Le schéma proposé par Goldbeter (Fig. 7) rend compte qualitativement et quantitativement de ce phénomène. L'APMc extracellulaire interagit préférentiellement avec la forme non phosphorylée du récepteur qui

active alors la cyclase et augmente la production d'AMPc. Cependant la liaison du ligand au récepteur « sensible » (R sur la Figure 7) accélère aussi sa « désensibilisation » par phosphorylation faisant ainsi baisser la production d'AMPc. Le développement des équations cinétiques, étape par étape, et la modélisation du phénomène ont permis de rendre plausible ce modèle (Goldbeter, 1984). Quels que soient les développements ultérieurs et les raffinements des détails de ce type de réaction, l'intérêt de cette conceptualisation est de montrer la plausibilité de l'hypothèse. Comme pour la régulation de la glycolyse, la modification de la conformation des protéines-clefs – PFK ou récepteur d'AMPc, par allostérie ou par phosphorylation – déphosphorylation peut rendre compte de la nature oscillante, périodique des phénomènes biologiques.

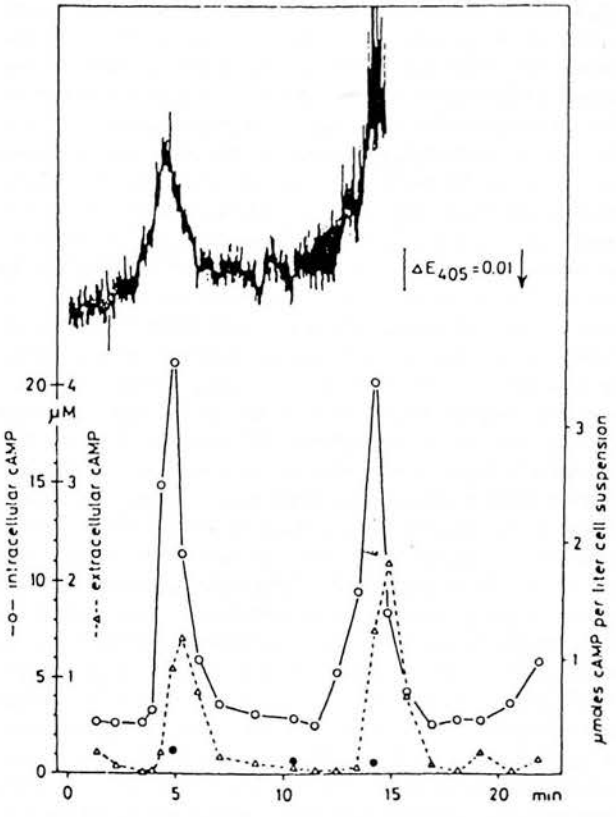

FIG. 6. – Oscillations d'AMP cyclique intracellulaire et extracellulaire dans des suspensions de *D. discoideum*. Les oscillations sont en phase avec celles de la diffusion de lumière (Gerisch & Wick, 1975).

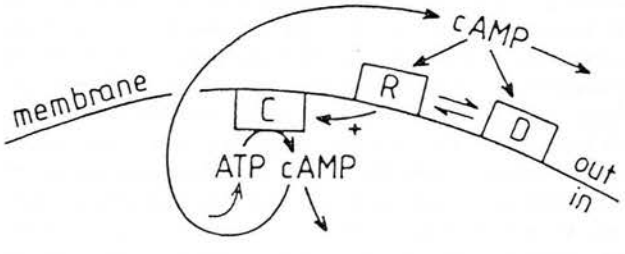

FIG. 7. – Modèle pour la synthèse de cAMP chez *D. discoideum* fondé sur la désensibilisation du récepteur pour l'AMP cyclique. Le cAMP extracellulaire se lie aux formes active (R) et désensibilisée (D) du récepteur. La liaison du cAMP à la forme R provoque l'activation de l'adénylate cyclase (C), probablement via une protéine G (non représentée), de même que la transition réversible du récepteur vers la forme D. Le cAMP intracellulaire synthétisé est transporté au travers de la membrane dans le milieu extracellulaire. Les flèches dénotent la synthèse d'ATP et l'hydrolyse de l'AMP cyclique par les formes intra- et extracellulaire de la phosphodiestérase (Martiel & Goldbeter, 1984, 1987).

Périodicités et temps de réaction au niveau de l'organisme

Dès la naissance de la physiologie moderne et la mise au point des premières méthodes d'enregistrement des fonctions élémentaires de l'organisme, comme la respiration ou les battements cardiaques, la régularité de leur périodicité s'est imposée comme une caractéristique fondamentale de la vie. Les enregistrements sur cylindre enfumé de la respiration, puis à l'aide de galvanomètres à miroir de l'électrocardiogramme, ont permis de localiser les sources des impulsions à l'origine de ces rythmes. Pour certaines, comme la respiration, les « noyaux » à la base du cerveau jouent un rôle central. Pour d'autres, comme les battements cardiaques, un système autonome du myocarde comportant des cellules spécialisées – les noyaux sino-auriculaire, atrio-ventriculaire, faisceau de His, fibres de Purkinje – a pu être mis en évidence. Leur fonction est cependant modulée par le système nerveux autonome, sympathique-parasympathique, capable d'accélérer ou de ralentir les battements cardiaques. La régularité de ces fonctions périodiques a inspiré le concept de *l'homéostasie*, terme crée par Starling, et celui de la constance du milieu intérieur de Claude Bernard. Cependant les enregistrements en continu pendant de longues périodes des rythmes cardiaques (par "holter") ont permis de constater une certaine irrégularité des séquences. Le transformé de Fourier et l'application du formalisme du chaos déterministe a permis aux chercheurs américains de suggérer une modification de ces concepts de stabilité et constance des fonctions périodiques (Pikkujämsä *et al.*, 1999). Il s'est avéré que le fonctionnement du cœur normal est multifractal et obéit aux lois du chaos déterministe. La constance et la régularité des périodes ne se retrouvent que pour le cœur malade (Goldberger, 1996 ; Kaplan *et al.*, 1991). Le raffinement de ces calculs grâce à la collaboration d'équipes spécialisées en informatique a confirmé ces constatations et montré la séparation nette des valeurs calculées pour les cœurs normaux et pathologiques (Ivanov *et al.*, 1999). L'origine de ces altérations pathologiques réside dans le tissu cardiaque, dans les altérations pathologiques des cellules qui génèrent et conduisent l'excitation périodique déclenchant les contractions cardiaques.

L'organe central de la création et de la coordination des rythmes périodiques chez les vertébrés est évidemment le

système nerveux central. Sans entrer dans une discussion détaillée de cette thématique, abordée dans ce volume par Viviane Pouthas, citons seulement quelques études effectuées au niveau cellulaire. Ainsi dès le début de la neurobiologie moderne, Hebb a pu proposer un modèle simplifié pour les modifications d'interaction entre neurones comme par exemple au cours de l'apprentissage (pour une revue voir Robert, 1998). Ces « synapses hebbiennes » comportent trois neurones ; le renforcement d'une synapse permet d'intensifier la transmission du signal dans une direction déterminée. Une confirmation fort intéressante de ce principe a été publiée récemment par Plenz & Kital (1999). Un réseau cellulaire, dans l'aire pré-Boetzinger de la formation réticulée des noyaux sous-thalamiques lié à la partie externe du *globus pallidus*, est capable de générer et d'entretenir des excitations rythmiques pouvant fonctionner comme un "pacemaker" (donneur de temps) de la respiration.

Il paraît probable que plusieurs types de réseaux semblables fonctionnent en parallèle dans le système nerveux central pour assurer le "timing" des nombreuses fonctions conscientes et inconscientes que l'organisme effectue en permanence.

Limite de fonctionnement des systèmes périodiques, mécanismes du déclin, le vieillissement

Nos connaissances dans ce domaine sont très récentes. L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement date du milieu du XXe siècle (pour une revue voir Robert, 1983, 1989, 1994). L'observation princeps en ce qui concerne la limite de la prolifération cellulaire est celle de Hayflick & Moorhead (1961). Répétée des milliers de fois depuis, cette expérience a montré que des cellules eucaryotes non-transformées n'ont qu'un nombre limité de cycles cellulaires à leur disposition pendant leur vie en culture. Ce nombre, la « limite de Hayflick », est de l'ordre de 50 à 60 doublements de la population pour les cellules embryonnaires humaines (Hayflick, 1965). Ce nombre maximal de divisions baisse régulièrement avec l'âge des donneurs et s'accompagne d'un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques des cellules (pour une revue voir Macieira-Coelho, 1988). Pour un nombre relativement limité d'espèces, ce nombre maximal de doublement maximal de la population cellulaire en culture (DPC) augmente proportionnellement avec la durée de vie maximale de ces espèces. A la suite d'une série d'études récentes, cette « limite » est attribuée, pour certaines d'entre elles au moins, au raccourcissement des télomères au bout de chaque chromosome et à chaque division. Phénomène essentiellement « mécanique », la longueur d'ADN occupée par la polymérase échappe à la réplication, ce phénomène est cependant soumis à une régulation compliquée (Kipling & Faragher, 1999). La transfection du site actif de la télomérase, enzyme réprimée dans la plupart des cellules différenciées, a permis récemment une prolongation importante de la durée de vie réplicative des cellules sans transformation maligne. Le couplage de cette réexpression de la télomérase avec celle d'oncogènes (H-ras et antigène T de SV40) a permis récemment la transformation *in vitro* de cellules humaines normales en malignes (Hahn *et al.*, 1999). Nous avons affaire ici à la régulation de la durée maximale de la vie réplicative des cellules, un aspect particulier de la gestion du temps biologique. Ces régulations, illustrées par l'exemple des amibes, font encore appel à l'émission et la réception de signaux permettant la coordination des fonctions d'un grand nombre de cellules en voie de différenciation. C'est donc au niveau de ces régulations qu'il convient de chercher les mécanismes du déclin au cours du vieillissement. Or il s'est avéré au cours des dernières décennies que l'expression et le fonctionnement des récepteurs est limité dans le temps. Parmi les premières études on trouve les récepteurs ß-adrénergiques du myocarde dont l'expression baisse avec l'âge, avec des conséquences néfastes pour le fonctionnement cardiaque (Lakatta, 1993). Des phénomènes similaires ont pu être mis en évidence pour un certain nombre de récepteurs d'hormones. Le cas des récepteurs dopaminergiques du cerveau a été particulièrement bien étudié par G. Roth et son équipe à l'Institut National du Vieillissement (NIA du NIH) (1995). L'origine de ces pertes peut être multiple. Nos études ont porté sur le récepteur de l'élastine-laminine (REL) exprimé par plusieurs types cellulaires. Les études les plus détaillées ont porté sur les cellules mononucléées du sang et les cellules endothéliales (Varga *et al.*, 1989, 1997 ; Fülöp *et al.*, 1998 ; Faury *et al.*, 1995, 1997). Pour ces dernières, Faury *et al.* ont pu montrer que la présence d'agonistes (peptides d'élastine) déclenche une vasorelaxation $NO^{\div}$ dépendante (Faury *et al.*, 1995). Cet effet apparaît chez le jeune adulte (les études ont porté sur des anneaux d'aorte de rat précontractés par la noradrénaline) puis disparaît progressivement au cours du vieillissement de l'animal (Faury *et al.*, 1997). Les études sur les leucocytes humains ont confirmé le « découplage » du récepteur de sa voie de transmission normale (faisant intervenir une G-protéine, la voie des inositolphosphates et l'ouverture des canaux ioniques, Varga *et al.*, 1989). Au cours du vieillissement, l'inhibition de la protéine G par la toxine de *B. pertussis* n'inhibe plus le relargage de superoxyde après addition de l'agoniste. La production radicalaire « de base » est plus importante dans les cellules des personnes âgées que dans celles des jeunes (Varga *et al.*, 1997). Cette perte du contrôle des effets potentiellement nuisibles par le récepteur peut conduire à la détérioration de sa fonction et à la mort des cellules qui le portent. Ceci a pu être confirmé avec des lymphocytes T humains activés en culture. L'addition de concentrations croissantes de l'agoniste (peptide d'élastine) stimule la prolifération cellulaire mais augmente aussi la production d'une élastase apparemment identique à celle des PMN (Péterszegi *et al.*, 1996, 1998). En augmentant la concentration de l'agoniste dans le milieu de culture, on constate l'apparition de cellules mortes. Cette mort cellulaire provoquée par un métabolite « normal » (les produits de dégradation de l'élastine) est un exemple des conséquences néfastes produites par la sur-

charge (ou l'usage prolongé) des récepteurs. Il apparaît ainsi que le fonctionnement cellulaire normal a ses limites dont l'origine doit être cherchée dans la nature des réactions élémentaires médiées par ces récepteurs. D'autres réactions épigénétiques contribuent aussi au déclin cellulaire, faute de mécanismes de défense ou de contrôle efficace. Il en est ainsi de la réaction de Maillard qui implique des interactions non catalysées entre sucres réducteurs et fonctions amines des macromolécules (protéines et acides nucléiques) ainsi que des réactions radicalaires insuffisamment contrôlées par les mécanismes de défense de la cellule (Robert, 1989, 1994).

DISCUSSION

Ce bref parcours à travers des exemples des mécanismes de la « gestion du temps » par des cellules eucaryotes n'avait d'autre but que de poser le problème : comment les cellules, des unicellulaires aux organismes supérieurs, s'insèrent-elles dans le temps. Quels sont les mécanismes de coordination des fonctions cellulaires qui rythment la vie de la cellule ? Les exemples cités mettent en valeur au moins deux types de mécanisme élémentaire : la nature allostérique d'enzymes-clés rend possible le fonctionnement rythmique des voies métaboliques et permet ainsi leur adapatation à d'autres fonctions de la cellule suivant d'autres rythmes comme par exemple la biosynthèse des constituants cellulaires entre deux cycles de division. La périodicité des fonctions rend possible un comportement « quantique » des fonctions élémentaires et, de ce fait, facilite l'adaptation des rythmes rapides aux cycles plus lents. A un niveau d'organisation supérieur, le couplage des cellules par des systèmes « récepteur-agonistes » accompagné de la régulation de la « sensibilité » des récepteurs, le plus souvent par des processus de phosphorylation-déphosphorylation, permet des comportements cycliques. Le rôle essentiel de ces comportements cycliques est probablement l'adaptation de la vie aux cycles de la nature, la rotation de la terre, la succession des saisons. C'est pourquoi il me paraît raisonnable de chercher l'origine de ces comportements cycliques dans la nature même des réactions qui ont permis l'apparition de la vie cellulaire. Nous n'avons fait qu'esquisser dans cette brève revue les mécanismes plus compliqués de la régulation des comportements cycliques, situés au niveau du système nerveux central et médiés aussi par des hormones hypothalamo-hypophysaires. Il paraît néanmoins probable que le mécanisme de ces réactions puisse être aussi ramené à des fonctions moléculaires élémentaires comparables à celles évoquées ci-dessus : la biologie en général et la chronobiologie en particulier ont longtemps négligé de se pencher sur le problème des limites de fonctionnement, le déclin des cellules et de l'organisme. Le « cadeau du siècle », l'allongement considérable de l'espérance de vie moyenne permet à de plus en plus de personnes de dépasser les limites de vie imposées à nos ancêtres par la prédation et d'expérimenter les conséquences physiopathologiques du déclin des fonctions cellulaires à un âge avancé. La compréhension de ces mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire conditionnera leur contrôle et la prolongation d'une vie longue sans maladie.

BIBLIOGRAPHIE

Atkinson D. E., The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 1968, *7*, 4030-4034.

Brocks J. J., Logan G. A., Buick R. & Summons R. E., A new molecular window on early life. *Science*, 1999, *285*, 1025-1026.

Chance B., Hess B. & Betz A., DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, *16*, 182-187.

Chance B., Schoener B. & Elsasser S., Control of the waveform of oscillations of the reduced pyridine nucleotide level in a cell-free extract. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1964, *52*, 337-341.

Chance B., Pye K. & Higgins J., Waveform generation by enzymatic oscillators. *IEEE Spectrum*, 1967, *4*, 79-86.

Chance B., Pye E. K., Ghosh A. K. & Hess B., *Biological and biochemical Oscillators*, 1973, Academic Press, New York.

Duysens L. N. M. & Amesz J., Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphorydine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, *24*, 19-26.

Faury G., Ristori M. T., Verdetti J., Jacob M. P. & Robert L., Effect of elastin peptides on vascular tone. *J. Vasc. Res.*, 1995, *32*, 112-119

Faury G., Chabaud A., Ristori M. T., Robert L. & Verdetti J., Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides. *Mech. Age. Dev.*, 1997, *95*, 31-42.

Fülöp T., Jacob M. P., Khalil A., Wallach J., Robert L., Biological effects of elastin peptides. *Path. Biol.*, 1998, *46*, 497-506.

Gerisch G. & Wick U., Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from Dictyostelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, *65*, 364-370.

Getting P. A., Mechanisms of pattern generation underlying swimming in Tritonia II. Network reconstruction. *J. Neurophysiol.*, 1983, *46*, 64-79.

Ghosh A. K. & Chance B., Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, *16*, 174-181.

Ghosh A.K., Chance B., & Pye E.K., Metabolic coupling and synchronization of NADH oscillations in yeast cell populations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, *145*, 319-331.

Goldberger A. L., Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. *Lancet*, 1996, *347*, 1312-1314.

Goldbeter A. & Koshland D. E., Ultrasensitivity in biochemical systems controlled by covalent modification. Interplay between zero-order and multistep effects. *J. Biol. Chem.*, 1984, *259*, 14441-14447.

Goldbeter A., *Rythmes et chaos dans les systèmes biochimiques et cellulaires*, 1990, Masson, Paris.

Hahn W. C., Counter C. M., Lundverg A. S., Beijerbergen R. L., Brooks M. W. & Weinberg R. A., Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature*, 1999, *40*, 464-468.

Hayflick L. & Moorhead P. S., The serial cultivation of human diploid cell strains. *Expl. Cell Res.*, 1961, *25*, 585-621.

Hayflick L., The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Expl. Cell Res.*, 1965, *37*, 614-636.

Hess B. & Boiteux A., Mechanism of glycolytic oscillation in

yeast. I. Aerobic and anaerobic growth conditions for obtaining glycolytic oscillations. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1968a, *349*, 1567-1574.

Hess B. & Boiteux A., Control of glycolysis. In: *Regulatory functions of biological membranes*, Järnefelt J., Ed., 1968b, 148-162, Elsevier, Amsterdam.

Hess B., Boiteux A. & Krüger J., Cooperation of glycolytic enzymes. *Adv. Enzyme Regul.*, 1969, *7*, 149-167.

Hess B. & Boiteux A., Oscillatory phenomena in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 1971, *40*, 237-258.

Hess B. & Boiteux A., Substrate control of glycolytic oscillations. In: *Biological and biochemical oscillators*, Chance B., Pye E. K., Ghosh A. K., Hess B. Eds., 1973, 229-241, Academic Press, New York.

Ivanov P. Ch., Nunes Amaral L. A., Goldberger A. L., Havlin S., Rosenblum M. G., Struyik Z. R. & Stanley H. E., Multifractality in human heartbeat dynamics. *Nature*, 1999, *399*, 461-465.

Kaplan D. T., Furman M. I., Pincus S. M., Ryan S. M., Lipsitz L. A. & Goldberger A. L., Aging and the complexity of cardiovascular dynamics. *Biophys. J.*, 1991, *59*, 945-949.

Kipling D. & Faragher R. G. A., Aging hard or hardly aging. *Nature*, 1999, *398*, 191-193.

Klevecz R. R., Cellular oscillators as vestiges of a primitive circadian clock. In: *Cell cycle clocks*, Edmunds L. N. Ed., 1984, 47-61, Marcel Dekker, New York.

Lakatta E. G., Deficient neuroendocrine regulation of the cardiovascular system with advancing age in healthy humans. *Circulation*, 1993, *87*, 631-636.

Lloyd D. & Edwards S. W., Epigenetic oscillations during the cell cycles of lower eukaryotes are coupled to a clock, lifes slow dance to the music of time. In: *Cell cycle clocks*, Edmunds L. N. Ed., 1984, 27-46, Marcel Dekker, New York.

Lyell C., *L'ancienneté de l'homme prouvée par la géologie et remarques sur les théories relatives à l'origine des espèces par variation*, 1864, Garnier Frères, Paris.

Lyell C., *Principes de géologie*, 1866, I-II : Garnier Frères, Paris.

Macieira-Coelho A., *Biology of normal proliferating cells in vitro relevance for* in vivo *aging*, 1988, Karger, Basel.

Martiel J. L. & Goldbeter A., Oscillations et relais des signaux d'AMP cyclique chez *Dictyostelium discoideum* : analyse d'un modèle fondé sur la désensibilisation du récepteur pour l'AMP cyclique. *C. R. Acad. Sci.*, 1984, *298*, 549-552.

Martiel J. L. & Goldbeter A., A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in *Dictyostelium* cells. *Biophys. J.*, 1987, *52*, 807-828.

Painter P. R. & Tyson J. J., Periodic enzyme synthesis and the cell division cycle. In: *Cell cycle clocks*, Edmunds L. N. Ed., 1984, 173-192, Marcel Dekker, New York.

Peterszegi G., Robert A. M. & Robert L., Presence of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes, *C. R. Acad. Sci.*, 1996, *319*, 799-803.

Peterszegi G., Texier S. & Robert L., Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1999, *29*, 166-172.

Pikkujämsä S. M., Mäkikallio T. H., Sourander L. B., Räihä I. J., Puukka P., Skyttä J., Peng C. K., Goldberger A. L. & Huikuri H. V., Cardiac interbeat interval dynamics from childhood to senescence. Comparison of conventional and new measures based on fractals and chaos theory. *Circulation*, 1999, *100*, 393-399.

Plenz D. & Kital S. T., A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external *globus pallidus*. *Nature*, 1999, *400*, 677-682.

Richet P., *L'âge du monde*, 1999, Éditions du Seuil, Paris.

Robert L., *Mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement*, 1983, Masson, Paris.

Robert L., *Les horloges biologiques*, 1989, Flammarion, Paris.

Robert L., *Le vieillissement*, 1994, CNRS, Belin, Paris.

Robert L., *Le vieillissement du cerveau et les démences*, 1998, Flammarion, Paris

Tassy P., *L'arbre à remonter le temps*, 1998, Diderot Éditeur, Paris.

Varga Z., Jacob M. P., Robert L. & Fülöp Jr. T., Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Letters*, 1989, *258*, 5-8.

Varga Zs., Jacob M. P., Robert L., Csongor J. & Fülöp T. Jr., Age-dependent changes of k-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis. *Exper. Gerontol.*, 1997, *32*, 653-662.

Venieratos D., & Goldbeter A., Allosteric oscillatory enzymes: influence of the number of protomers on metabolic periodicities. *Biochimie*, 1979, *61*, 1247-1256.

Zheng B., Larkin D. W., Albrecht V., Sage M., Eichele G., Lee Cheng Chi & Bradly A., The mPer 2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, 1999, *400*, 169-173.