

# Physiologie, une science qui se réveille

Bernard Swynghedauw, Pascale Mansier

*La physiologie ou biologie intégrée se trouve confrontée aux immenses acquis fournis par les différents programmes génomes et se doit de retrouver un second souffle. (1) Les développements récents des techniques de transfert génique, en particulier de la technologie transgénique, ont permis la mise en œuvre d'une véritable physiologie inverse ; encore faut-il que cette physiologie prenne en compte la totalité de l'organisme et inclue non seulement les modifications attendues de l'expression phénotypique, mais aussi diverses transrégulations ou des changements liés au développement. (2) L'étude des oscillateurs biologiques sur organisme entier (les rythmes cardiaques, respiratoires...) ou à l'échelon cellulaire (les oscillations du calcium ou de l'AMPc) connaît un*

*développement récent, lié aux progrès de l'informatique. Il y a maintenant des outils permettant divers types d'analyse non linéaire et surtout d'analyses croisées. (3) La génomique fonctionnelle qui est un produit de la génomique structurale fournit un outil d'intégration complet de l'activité cellulaire. Cet outil est pour le moment essentiellement limité aux transcrits, mais il deviendra rapidement applicable aux protéines, et aux fonctions. Le projet Physiome, proposé par certains, doit d'abord permettre l'accessibilité à tous des données dont certaines sont encore confidentielles, il devrait ensuite permettre l'intégration de ces données dans des systèmes plus complets.*

**V**ieille dame désintégrée depuis une décennie par les assauts de la toute puissante biologie moléculaire et de la non moins prédominante génétique moléculaire, la physiologie (« étude de la logique de la nature » est la traduction littérale des caractères chinois utilisés pour définir la physiologie ; « biologie intégrée » serait plus adapté [1]) se doit-elle de retrouver un nouveau souffle ? Cette quête est réclamée par d'autres disciplines. Rien ne sert en effet de fabriquer quelque subtile construction censée inhiber le récepteur de la thrombinine type 2b sous-type  $\alpha 2$ , si l'on ne peut trouver quelqu'un qui n'ait pas trop peur du sang, sache faire un point de suture, isoler une anse intestinale, et puisse mesurer de façon fiable une pression artérielle, un débit rénal chez le chien, le singe voire la souris. La toute naissante génomique fonctionnelle [2], si elle cherche à intégrer à grand renfort de

bio-informatique des données – totalement non fonctionnelles puisqu'il s'agit en règle d'ARNm – se devra bien un jour ou l'autre de devenir réellement physiologie ou biologie intégrée. Reste enfin cet incomparable outil qu'est la technologie transgénique, là aussi la demande est immense ; elle vient à la fois des biologistes cellulaires, qui qualifient de fonction une modification morphologique nanométrique dont la signification est elle-même hypothèse de travail, et des généticiens qui se contentent le plus souvent d'un changement d'expression pour conclure. L'ambiguïté du terme « phénotype » témoigne d'ailleurs de ce déficit puisqu'en pratique, on entend par là essentiellement l'ARNm et la protéine, alors qu'étymologiquement parlant ce terme devrait être réservé à la seule fonction.

Encore faudrait-il qu'il y ait encore des physiologistes ! Les milieux scientifiques se reproduisent par clonage et

l'effondrement d'une discipline entraîne rapidement sa non-représentation dans les différentes instances chargées dudit clonage. Il faut ensuite de la part des représentants des disciplines nouvelles une exceptionnelle prescience ou un trop rare héroïsme pour soutenir des candidatures aussi hétérodoxes. Mais encore faudrait-il qu'il y ait aussi des physiologistes au fait des acquis de la biologie contemporaine. Les physiologistes sont eux-mêmes les premiers responsables de la décadence de leur propre spécialité. On entend en effet encore beaucoup trop de plaidoyers *pro domo* émis au nom de la physiologie intégrée, soulignant les méfaits du réductionnisme ambiant, mais ignorant superbement les récents acquis du Programme Génome et refusant avec hauteur, parfois même au nom de la morale (sic !), les explorations physiologiques faites sur des animaux transgéniques.

On peut légitimement se poser la question de savoir s'il est si néces-

saire de dépenser beaucoup d'énergie pour sauver ce navire en perdition. Allen Cowley, le nouveau président de l'*American Society of Physiology*, la toute puissante propriétaire des 8 ou 10 *American Journal of Physiology*, a lui-même tout récemment soulevé le débat [3]. Le *Long Range Planning Committee* [4] devine une lueur sous les nuées actuelles (*The sun breaks through the clouds: a bright future for physiology*). La cardiologie, discipline-frontière par excellence, s'est préoccupée du problème, et l'*American Heart Association* [5] a créé une structure de travail à cet effet. On se propose ici de délimiter quelques pistes susceptibles de renouveler la discipline (sinon ses structures), et de répondre aux besoins d'intégration qui se font maintenant jour de façon plus pressante. Ces pistes conduisent naturellement à des projets comme le projet Physiome [6, 7] qui sera détaillé ultérieurement.

### Physiologie inverse

La première de ces pistes est liée au développement et à la banalisation des techniques de transfert génique qui deviennent maintenant plus accessibles. Le renouveau, déjà évoqué par d'autres [3], est ici à la fois conceptuel et technique. Les possibilités offertes par les techniques de transfert génique (ou de mutagenèse dirigée) ont permis de développer une nouvelle approche de la physiologie que l'on pourrait qualifier d'inverse et qui consiste à modifier une fonction en changeant le gène qui en a la responsabilité. Par opposition, le point de départ en physiologie classique est une fonction, les gènes déterminant ladite fonction n'étant qu'hypothèses de travail. Les transferts géniques se faisant habituellement chez la souris, il s'en est suivi une demande accrue d'informations sur la physiologie, jusque-là méconnue, de ce murin (qui n'est pas qu'un petit rat comme on l'a d'abord pensé [8]). Sur un plan strictement physiologique, la technologie transgénique a permis de confirmer, parfois d'infirmer, le rôle déterminant de très nombreux gènes dans diverses fonc-

tions physiologiques, mais elle a également fourni des renseignements témoignant de la mise en jeu de fonctions jusqu'alors méconnues, en particulier de transrégulations, ce qui a permis de développer de nouveaux concepts, en réceptologie en particulier (discuté dans [9]).

### Physiologie des oscillateurs

La seconde voie est liée au développement et à la banalisation des outils informatiques, qu'il s'agisse d'outils d'analyse, ou d'analyse croisée non linéaire des oscillateurs biologiques, ou d'outils permettant d'étudier les systèmes biologiques comme des ensembles. Ces outils peuvent être dérivés de la théorie du chaos, mais cette théorie ne recouvre pas la totalité des moyens d'analyse non linéaires [10]; elle a ses limites et surtout ses insuffisances quand elle est appliquée à la biologie. Cet article n'étant pas une revue sur le chaos et les systèmes non linéaires, le lecteur qui souhaiterait se rafraîchir la mémoire sur ce sujet pourra se référer à deux ouvrages de base: le livre de Berger *et al.* [11] et la revue de *Physiological Review* par Elbert *et al.* [12].

L'étude des oscillateurs biologiques est un des fondements de la physiologie puisqu'elle intègre, en fonction du temps, les différentes composantes phénotypiques. Le cycle respiratoire, les oscillations de l'activité électrique du cerveau (EEG), le rythme cardiaque (ECG) ou les variations de la pression artérielle, l'activité physique inconsciente, voire certains rythmes circadiens ou ultradiens ont la particularité de pouvoir être enregistrés en permanence chez l'homme comme chez l'animal [13]. Les variations cycliques de l'AMPC ou du calcium intracellulaire sont d'abord technique plus difficile; leur étude dynamique a néanmoins été entreprise par quelques biologistes précurseurs et un peu marginaux [14]. Tous les oscillateurs biologiques sont le reflet d'interactions complexes intégrées de divers systèmes biologiques. Tous enfin interagissent les uns avec les autres.

### Sur organisme entier

On peut rechercher les principaux déterminants directement en cause dans le fonctionnement d'un oscillateur, c'est-à-dire par exemple en ce qui concerne le rythme cardiaque, le système nerveux central, les arcs réflexes médullaires et les récepteurs périphériques (*figure 1*). La technologie transgénique est dans ce domaine irremplaçable.

L'ECG, l'EEG, le rythme respiratoire, et probablement la plupart des rythmes circadiens ont paradoxalement la particularité d'avoir une activité relativement régulière et reproductible d'un individu à l'autre et même d'une espèce à l'autre. En d'autres termes la dynamique de ces oscillateurs, si elle est complexe, a la particularité d'aboutir à un état stable. Le rythme cardiaque, par exemple, est au repos à 70 battements par minute chez tous les hommes; il peut passer à 90-100 à l'exercice, mais retourne rigoureusement à 70 à l'arrêt de l'effort. Ses variations, au repos ou à l'effort, ne dépassent pas 10% à 20% (*figure 1*). Tout écart hors de ces normes est du domaine de la pathologie.

Il est difficile, et controversé, de mettre en évidence un ordre non linéaire, voire chaotique, dans la plupart des oscillateurs nonobstant la multiplicité des paramètres mis en cause, ces difficultés reflétant à la fois les limites des techniques disponibles et la complexité des phénomènes biologiques. Les divers oscillateurs biologiques interagissent en effet les uns avec les autres. Le rythme sinusal cardiaque est, lui-même, le reflet, partiel, d'autres oscillateurs comme le rythme respiratoire, les variations de la pression artérielle (le baroréflexe) et les rythmes circadiens (*figure 2*). Les techniques d'analyse croisée sont ici indispensables [15]. Sur un plan presque philosophique, il est évidemment tentant d'affirmer, et certains l'ont fait [16], que la vie, la santé, la jeunesse sont liées à la complexité, au non-linéaire, au chaos, et que, à l'inverse, l'approche de la mort, la maladie, la sénescence, sont caractérisées par des oscillations de moins en moins prononcées et de plus en plus régulières, mais cette déclaration de principe, si elle a

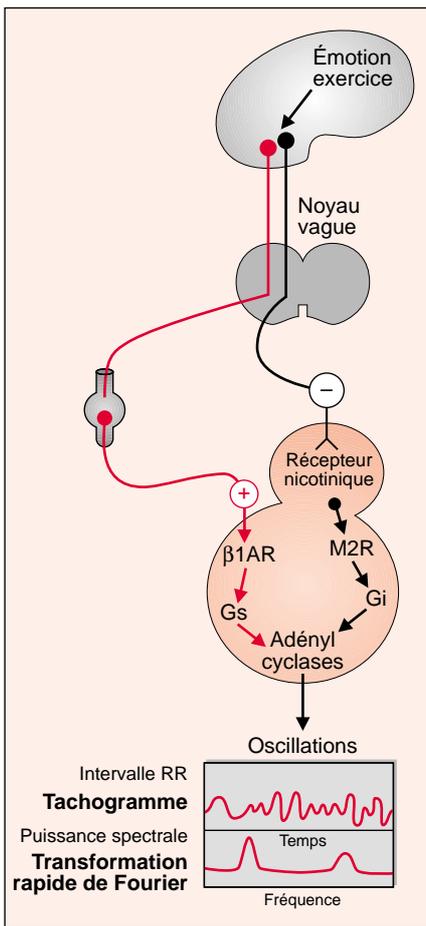


Figure 1. **Les principaux déterminants biologiques du rythme cardiaque.** De haut en bas: le cortex cérébral, la moelle épinière, les relais ganglionnaires, les récepteurs adrénergiques et muscariniques myocardiques, les variations de l'intervalle RR (celui qui sépare deux battements sur un ECG) et leur analyse spectrale.  $\beta 1AR$ : récepteur  $\beta 1$  adrénergique;  $M2R$ : récepteur muscarinique.

quelque chance d'être vraie, demande pour l'instant à être confirmée par les faits. La frontière entre le désordre stochastique et l'ordre chaotique n'est pas, par définition –le chaos se définissant comme une organisation qui a les apparences du désordre – évidente.

La description la plus complète d'un système déterministique, comme un système biologique, disons le rythme cardiaque [13], se fait en construisant un espace de phase, c'est-à-dire un système coordonné dont les axes sont

des variables indépendantes du système à l'étude [12]. Ce sont, dans l'exemple classique du pendule, l'angle et la vitesse angulaire. Il s'agit dans ce cas d'un système à deux dimensions. Mais en biologie, bien évidemment, il y a plusieurs pendules dont les balancements sont interdépendants, et le nombre de variables est infiniment plus élevé. Là est tout le problème; les outils capables d'appréhender avec certitude la dimension de systèmes à très grande dimension sont nombreux, trop nombreux (discuté dans [12]), et il paraît évident que, pour l'instant, le recul manque encore pour que l'on puisse considérer tel ou tel algorithme comme étant l'évangile (ou plutôt le papier bible!). Une des conclusions de la quasi-totalité des articles consacrés à l'analyse non linéaire de systèmes biologiques est qu'il n'existe pas un seul test qui soit capable de caractériser à lui seul un système biologique dans sa totalité. Il est nécessaire d'utiliser une batterie de tests [12, 13, 17].

### À l'échelon cellulaire

Les propriétés rythmiques des systèmes biologiques sont connues depuis très longtemps [18], ce type d'oscillateurs est néanmoins encore assez peu étudié [14], bien qu'*a priori* les déterminants y soient plus simples. La mise en évidence indiscutable de la structure chaotique d'un rythme biologique a probablement été faite la première fois en analysant les oscillations de la concentration en AMPc chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* et leurs relations avec le développement de cette espèce très particulière [14]. Cette amibe passe, en effet, au cours de son développement d'un stade unicellulaire à un stade pluricellulaire (acrasie) grâce à l'émission périodique d'un signal AMPc. La périodicité de ce signal a une dynamique chaotique qui a la forme d'un attracteur étrange et survient à des instants précis sur un diagramme de bifurcation. Ce type de structure dynamique a également été retrouvé pour les oscillations de la glycolyse. D'autres exemples ont été fournis dont les oscillations de la concentration du calcium cytosolique [14]. La microcirculation a fourni à l'équipe de T. Griffith [19] un maté-

riel privilégié pour démontrer l'organisation chaotique de la vasomotricité. La pulsativité du flux sanguin artériolaire est irrégulière, et ces irrégularités sont dues à la fois à la complexité des facteurs réglant la vasomotricité et à celle des facteurs rhéologiques. Les variations de la pression artériolaire ont une dynamique chaotique et, dans des conditions physiologiques, cette structure dynamique est indépendante du niveau de pression puisque la dimension de corrélation du système reste la même quel que soit le débit, soulignant bien qu'il s'agit d'une propriété intrinsèque au système. A l'inverse, on peut modifier cette dimension de corrélation par des manipulations pharmacologiques.

Les systèmes chaotiques sont, par définition, sensibles aux déterminants initiaux (le célèbre battement des ailes d'un papillon en Australie qui crée une tempête en Alaska), la mise en évidence d'une dynamique chaotique rend compte des effets inattendus d'une petite manipulation pharmacologique. Ladite micromanipulation peut changer gravement la dynamique d'un système de plusieurs manières: (1) certains systèmes fonctionnent au moyen de plusieurs attracteurs, comme la vasomotricité artériolaire, et l'intervention pharmacologique en supprimant l'un de ces attracteurs va modifier du tout au tout la dynamique préexistante; (2) la dynamique peut être organisée sur un attracteur possédant deux ailes, comme l'attracteur de Lorenz, et la manipulation pharmacologique entraîne le passage de l'une à l'autre « aile » de l'attracteur; (3) enfin il est des systèmes, comme le rythme cardiaque sinusal, qui fonctionnent probablement à l'état normal selon une dynamique linéaire [20], et la molécule, ou la manipulation physiologique, induisent une bifurcation, et l'apparition d'un attracteur étrange... Tout reste à faire !

### La génomique fonctionnelle, nouvelle branche de la physiologie ?

Reste enfin la génomique fonctionnelle elle-même qui, lorsqu'elle utilisera les protéines pourrait devenir un

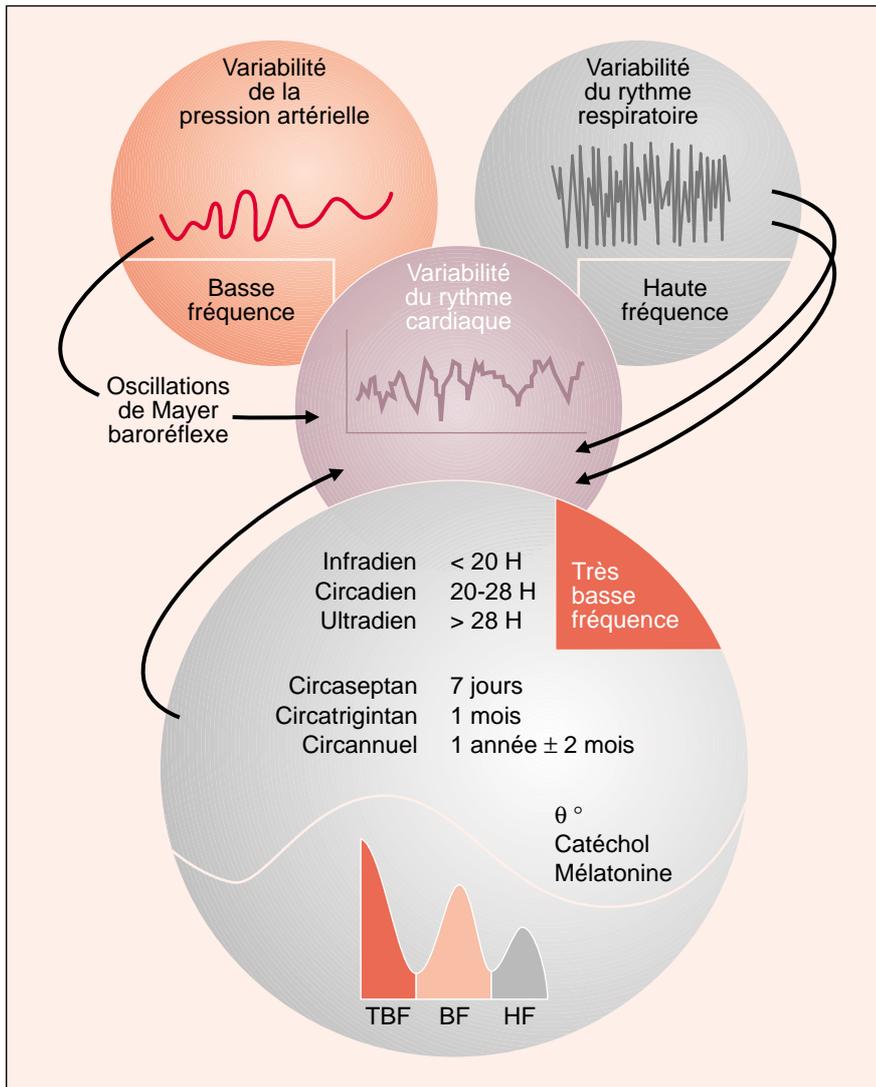


Figure 2. **Les principaux oscillateurs biologiques dont l'activité interfère avec celle du rythme sinusal cardiaque.** Les variations du rythme sinusal (au centre, en intervalles RR) dépendent des variations de la pression artérielle (en haut et à gauche, ondes de Mayer et baroréflexe), de basse fréquence, de celles de la respiration (en haut et à droite, d'origine vagale), de fréquence élevée, et des rythmes circadiens (en bas, de très basse fréquence). Tout à fait en bas du schéma: analyse spectrale du rythme cardiaque (transformée de Fourier) montrant les trois groupes d'oscillations sus-décrits.

fantastique outil de compréhension intégrée. Cette nouvelle branche de la génétique se définit par opposition à la génomique structurale. On entend généralement par là le développement ou l'application d'approches expérimentales globales (aux niveaux génomiques ou systémiques) ayant pour objet l'étude de la fonction des gènes en utilisant les informations et les réactifs fournis par la génomique structurale [2]. On connaît mainte-

nant la quasi-totalité des gènes de *Saccharomyces cerevisiae*. En utilisant la technique des puces à ADN, ces gènes peuvent être isolés et collés sur des plaques. On peut ensuite hybrider ces plaques avec de l'ARN isolé à partir de levures soumises à un régime déterminé. La suppression du glucose, par exemple, induit la surexpression de 893 gènes et réprime l'expression de 1 233 gènes [21]. Notre bon vieux cycle de Krebs doit

être complètement redessiné, pour ne s'en tenir qu'à lui. Il faudra par exemple au physiologiste repenser l'effet Pasteur d'une manière radicalement différente de celle qu'il a eu l'habitude d'enseigner. L'activité de ces enzymes n'est plus en effet le seul élément à prendre en compte, mais aussi, et c'est nouveau, leur concentration qui est, probablement, loin d'être stationnaire. Ce genre de méthodes est maintenant appliqué chez l'homme, grâce à des «kits», relativement onéreux (et dont la fiabilité demande souvent à être contrôlée) [22].

Le développement des techniques directement issues du Programme Génome Humain a engendré une multitude de nouvelles techniques de ce type – *Expressed Sequence Tags (EST)*, *Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)*, etc. – qui, combinées à un accès de plus en plus aisé aux banques de données (*Internet cloning*) fournissent une ahurissante accumulation de données. Récemment, la revue *Circulation*, dans un des plus longs articles de son histoire [23], a rendu publics plusieurs dizaines de milliers de transcrits exprimés dans le système cardiovasculaire. La moitié seulement de ces séquences a été identifiée dans une banque de données. Ce matériel doit maintenant être organisé pour le rendre fonctionnel. Des exemples identiques se retrouvent dans tous les domaines, en particulier en cancérogenèse [24].

Il ne s'agit pas ici de faire de la chélation forcée et de vouloir faire entrer cette nouvelle discipline dans le giron d'une vieille mère physiologie. La génomique fonctionnelle est clairement une sécrétion de la génomique structurale, pas de la physiologie. Par ailleurs la génomique fonctionnelle n'utilise que des transcrits [2], et les seules fonctions que l'on peut ainsi réellement étudier sont celles des facteurs de transcription, il serait évidemment abusif de considérer ce genre d'abord comme physiologique. Il n'existe pas, pour le moment, de *protein microarrays*, mais on peut facilement prédire qu'un tel outil sera rapidement disponible. La fonction macroscopique des transcrits orphelins (en particulier ceux qui sont analogues à des séquences connues pour coder pour des détecteurs universels

sensibles à l'étirement, à la pression ou au volume [25], peut elle-même être étudiée en utilisant la technologie transgénique, et c'est probablement à ce moment que le lien avec la physiologie deviendra possible.

Il est certain que le temps est venu de développer des outils, informatique et banque de données, permettant d'intégrer les données fournies par le programme génome ou celles accumulées récemment dans tous les domaines de la pathologie (un bon exemple en est le remodelage cardiaque) [26]. Cette évidence est à l'origine de plusieurs projets, publics ou privés, comme le projet physiome [6]. La première étape de ces projets est de rendre accessible à la totalité de la communauté scientifique l'ensemble des données relatives au génome, c'est loin d'être fait. La seconde étape sera bien entendu l'intégration de ces données au sein de systèmes dûment identifiés et localisés, comme c'est déjà le cas pour le *pace-maker* cardiaque par exemple [27] ■

## RÉFÉRENCES

- Schultz SG. Homeostasis, humpty dumpty, and integrative biology. *News Physiol Sci* 1996; 11: 238-46.
- Hieter P, Boguski M. Functional genomics: it's all how you read it. *Science* 1997; 278: 601-7.
- Cowley AW Jr. Can APS capture the bright future of physiology? *The Physiologist* 1997; 40: 49-64.
- Long Range Planning Committee. The sun breaks through the clouds: a bright future for physiology. *The Physiologist* 1996; 39: 375-88.
- Heistad DD, Fakunding J. Special emphasis panel on integrative research. *Circulation* 1997; 95: 1977.
- Bassingthwaighte JB. A view of the Physiome. [www.physiome.org](http://www.physiome.org). Conferences reports, 1997.
- APS CV Section. Beginning the human physiome project. *APS CV Section News* 1997; 3.
- Mansier P, Médigue C, Charlotte N, et al. Decreased heart rate variability in transgenic mice overexpressing atrial  $\beta_1$ -adrenoceptors. *Am J Physiol* 1996; 271: H1465-72.
- Swynghedauw B. Transgenic models of myocardial dysfunction. *Heart Failure Rev* 1996; 1: 277-90.
- Denton TA, Diamond GA, Helfant RH, Khan S, Karagueuzian H. Fascinating rhythm: a primer on chaos theory and its application to cardiology. *Am Heart J* 1990; 120: 1419-40.
- Berger P, Pomeau Y, Dubois-Gance M. *Des rythmes au chaos*. Paris: Odile Jacob, 1994.
- Elbert T, Ray WJ, Kowalik ZJ, Skinner JE, Graf KE, Birbaumer N. Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol Rev* 1994; 74: 1-47.
- Mansier P, Clairambault J, Charlotte N, et al. Linear and non-linear analysis of Heart Rate variability: a minireview. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 371-9.
- Goldbeter A. *Biochemical oscillations and cellular rhythms. The molecular bases of periodic and chaotic behaviour*. New York: Cambridge University Press 1996.
- Saul JP, Berger RD, Chen MH, Cohen RJ. Transfer function analysis of autonomic regulation II. Respiratory sinus arrhythmia. *Am J Physiol* 1989; 256: H153-61.
- Lipsitz LA, Goldberger AL. Loss of « complexity » and aging. Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *JAMA* 1992; 267: 1806-9.
- Webber CL, Zbilut JP. Dynamical assessment of physiological systems and states using recurrence plot strategies. *J Appl Physiol* 1994; 76: 965-73.
- Fessard A. *Propriétés rythmiques de la matière vivante*. Paris: Hermann, 1936.
- Griffith TM. Temporal chaos in the microcirculation. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 342-58.
- LePape G, Giacomini H, Swynghedauw B, Mansier P. A statistical analysis of sequences of cardiac interbeat intervals does not support the chaos hypothesis. *J Theor Biol* 1997; 184: 123-31.
- Derisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278: 680-6.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1 000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10614-9.
- Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, et al. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine. Toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* 1997; 96: 4146-203.
- Zhang L, Zhou W, Velculescu V, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276: 1268-72.
- Pashmforoush M, Chien KR. Tangled up in blue. Molecular cardiology in the postmolecular area. *Circulation* 1997; 96: 4126-30.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215-62.
- Noble D. The Physiome Project in understanding the heart: the Cardiome. In *The Physiome Project*. August 25 1998. <http://www.physiome.org/files/Petrodvo-ret.1997/abstracts/noble.html>. Conferences reports.

## Summary

### A new jouvence in physiology

Physiology, or integrative biology, is currently facing the enormous accumulation of data produced by the genome programmes, and has to find new jouvences. Several areas were proposed in this article. (1) Several progresses in gene transfer technology, including transgenic technology, gave rise to a new concept, namely reverse physiology. Nevertheless, reverse physiology has also to account for transregulations and developmental modifications. (2) Studies on biological oscillators, either at the organ level (cardiac or respiratory rhythms) or at a cellular level (calcium or cAMP oscillations) were recently developed using new computer programmes that facilitate both non linear analysis and cross-analysis. (3) Functional genomics derived from genomics, nevertheless it is for the moment limited to transcripts. It should become a tool to study and integrate the whole cell activity providing proteins and function could be approached in the same way. The Physiome project is one of the projects that aim to both facilitate access to data from the genome project and to develop integrative programmes.

### Bernard Swynghedauw

Docteur en médecine, docteur ès sciences, ancien interne des hôpitaux de Paris, directeur de recherches à l'Inserm, président élu de la FEPS (Federation of European Society of Physiology).

### Pascale Mansier

Docteur ès sciences, chargée de recherches à l'Inserm.  
Inserm U. 127, Hôpital Lariboisière, 41, boulevard de la Chapelle, 75475 Paris Cedex 10, France.

### TIRÉS À PART

B. Swynghedauw.