

Sénescence et mort cellulaire

A) Introduction

1. Définition générale :

Ce sont des mécanismes de régulation du cycle cellulaire et en particulier des mécanismes de réponse au stress, qui équivaut à une rupture de l'homéostasie.

=> Lorsque la cellule subit un stress, elle va pouvoir prendre plusieurs décisions :

<u>Quiescence :</u>	Arrêt transitoire de son cycle cellulaire, métaboliquement active
<u>Sénescence :</u>	Arrêt permanent de son cycle cellulaire, métaboliquement active
<u>Apoptose :</u>	Stress trop grand => Mort programmée , métaboliquement inactive

2. les marqueurs :

Les marqueurs permettent de différencier ces différents états :

Etats	Mitotique	Apoptotique	Sénescence
Marqueur	Ki67	Caspase3	SABGal
Type	Absolu	Absolu	Relatif
Précision	Un marquage positif au ki67 rend les cellules foncées. Il DEMONTE que ces cellules sont en train de se diviser.	Un marquage positif au Caspase3 rend les cellules foncées. Il DEMONTE que ces cellules sont en train de mourir.	Un marquage positif est caractérisé par une coloration bleue des cellules. Mais cela peut aussi bien représenter une augmentation de l'activité lysosomiale. Ce marqueur relatif suggère que les cellules sont sénescences.

3. Historique

Au cours de l'histoire, différents dogmes se sont succédé sur la durée de vie d'une cellule :

Période	Mode de pensée
Avant 1960	→ Les cellules en culture peuvent se diviser infiniment → Elles ne sont <u>pas soumises au vieillissement</u> (elles sont immortelles)
Après 1960 avec Hayflick	→ Une cellule arrête de se diviser au bout d'un certain nombre de divisions (environ 50), on parle de limite d'Hayflick → Les cellules gardent en mémoire le nombre de divisions qu'elles ont déjà effectuées indépendamment du temps = âge réplcatif ou potentiel prolifératif → Naissance de la notion de sénescence cellulaire

B) Sénescence

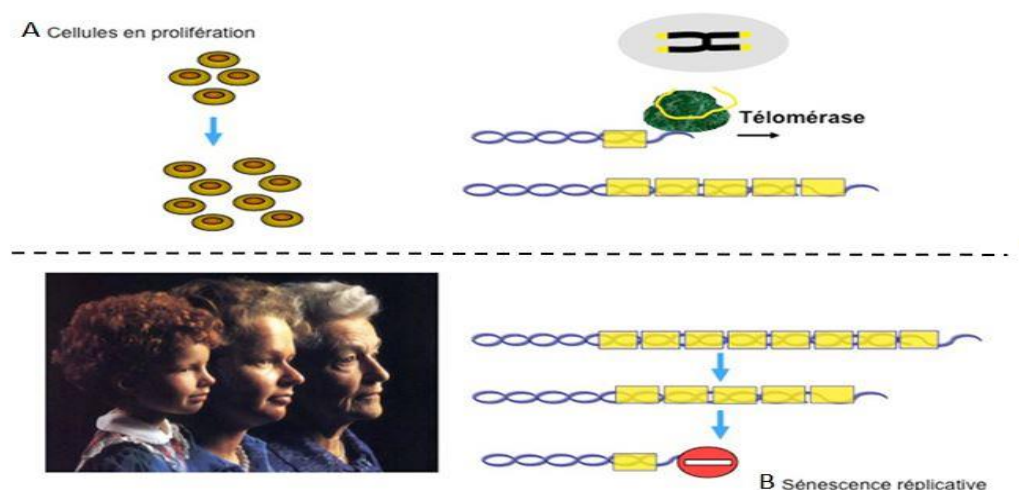
1. Causes de la sénescence

a) La sénescence réplcative : 1998

La sénescence réplcative est causée par l'érosion somatique des télomères.

Les **extrémités** chromosomiques des cellules de l'organisme qui ne possèdent pas l'équipement enzymatique nécessaire (= **télomérase**, présente dans certaines cellules souches, germinales, pendant l'embryogénèse...) **s'érodent** au fur et à mesure des divisions. C'est la conséquence du **processus moléculaire physiologique**.

A partir d'un certain nombre de division, le **raccourcissement** des télomères devient **critique**, car certains gènes importants disparaissent et la cellule déclenche la voie de signalisation des dommages à l'ADN, cette voie aboutit à l'activation de la protéine **P53** qui déclenche la sénescence ou l'apoptose.



b) Le stress oncogénique : 1997

Lors de la **mutation** de la **protéine RAS**, mutant gain de fonction, il y a une activation supra-physiologique de la voie de signalisation contrôlant le cycle cellulaire (voie des MAP-kinases), la cellule se met à **se diviser** de

manière **aberrante**.

- La **vitesse** de division importante cause des **défauts de réplication de l'ADN**.
- Les **dommages à l'ADN** aboutissent à l'**activation de la protéine P53** qui déclenche la **sénescence**.

Ça **suggère** que la sénescence nous protège du cancer en arrêtant la prolifération.

c) Sénescence prématurée

Différents mécanismes vont agir sur les **voies de signalisation** de dommages cellulaires, qui vont eux même induire un stress **insurmontable** pour la cellule qui entre en sénescence voir en apoptose.

La sénescence est un processus d'apoptose stoppé précocement.

2. Caractéristique de la sénescence

D'un point de vue cellulaire, on définit la sénescence par une **combinaison de caractéristiques** qui ne sont **pas forcément spécifiques** de la sénescence. On va donc corréler plusieurs marquages pour être sûr de l'état de notre cellule.

a) Caractéristique intra-cellulaire

<u>Arrêt de prolifération :</u>	Facilement repérable via un cytomètre de flux
<u>Morphologique :</u>	Les cellules sénescents sont des cellules aplaties , plus larges, aspect d'œuf au plat, difficilement repérable car le contour est peu réfringent .
<u>Noyau :</u>	Apparition de foyers d'hétérochromatine.
<u>Altération de l'activité β-Galactosidase :</u>	Normalement on ne détecte pas cette activité lysosomiale, sauf si la cellule est en sénescence.
<u>Test en laboratoire :</u>	En prenant des anticorps dirigés contre des protéines mis en jeu dans les voies de réponses des dommages à l'ADN des cellules sénescents, on observe l'augmentation de ces marqueurs
<u>Apoptose :</u>	Résistance à l'apoptose

b) Caractéristiques extra-cellulaire :

Sécrétion de facteurs spécifiques (ou SASP) :	<ul style="list-style-type: none">→ Libérés de manière endocrine(sang)/paracrine (MEC) lors d'un traumatisme par les cellules sénescents autours des tissus nécrosés→ Majoritairement des facteurs pro-inflammatoires, ainsi que des enzymes de remodelage tissulaire facteur de croissance (héréguline)→ Cette inflammation locale est ambivalente :
---	--

<p>=> <u>Courte durée</u> : Les cellules aux alentours vont libérer leurs facteurs spécifiques, afin de recruter les cellules de l'immunité et favoriser la cicatrisation.</p> <p>=> <u>Longue durée</u> : Si un grand nombre de cellules sénescents persistent, cette inflammation va être responsable du phénomène de vieillissement car engendre une déstructuration de la matrice extra-cellulaire.</p>
--

3. Devenir des cellules sénescents

Une expérience effectuée sur des souris atteint d'un hépatocarcinome a permis de mettre en évidence le devenir des cellules sénescents dans l'organisme :

- **Initialement**, dans l'organisme, le **système immunitaire** va considérer les cellules sénescents comme des cellules stressées et va les **éliminer**. C'est **l'immuno-surveillance**.
- **Cependant**, le système immunitaire est de moins en moins compétent avec le temps, ce qui va conduire à l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus, puis celles-ci vont générer un environnement pro-inflammatoire, qui va entraîner le **vieillissement** du tissu et ainsi de suite (sorte de cercle vicieux), C'est **l'immuno-sénescence**.

C) Mort cellulaire

Il existe 2 types de mort cellulaire très différentes : **l'apoptose et la nécrose**

L'apoptose :

Définition : L'Apoptose correspond à la **mort programmée** des cellules = « **suicide des cellules** »

a) Caractéristique de l'apoptose :

· physiologique ou pathologique
· déclenché de manière contrôlée par des signaux intra ou extra-cellulaire
· Contrôlé par la mise en place de cascades réactionnelles et l'activation de gènes spécifiques
· processus ATP-dépendant
· Absence de réponse inflammatoire, les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose

b) L'apoptose en physiologie :

- Embryogénèse : L'apoptose est mis en jeu lors du développement embryonnaire pour certains processus :

=> Modelage des **doigts**



=> Remodelage du nombre de neurones au niveau du cerveaux

Ces processus peuvent être source de **malformation** s'il y a un dysfonctionnement.

- Homéostasie tissulaire : L'apoptose contribue à l'équilibre cellulaire :

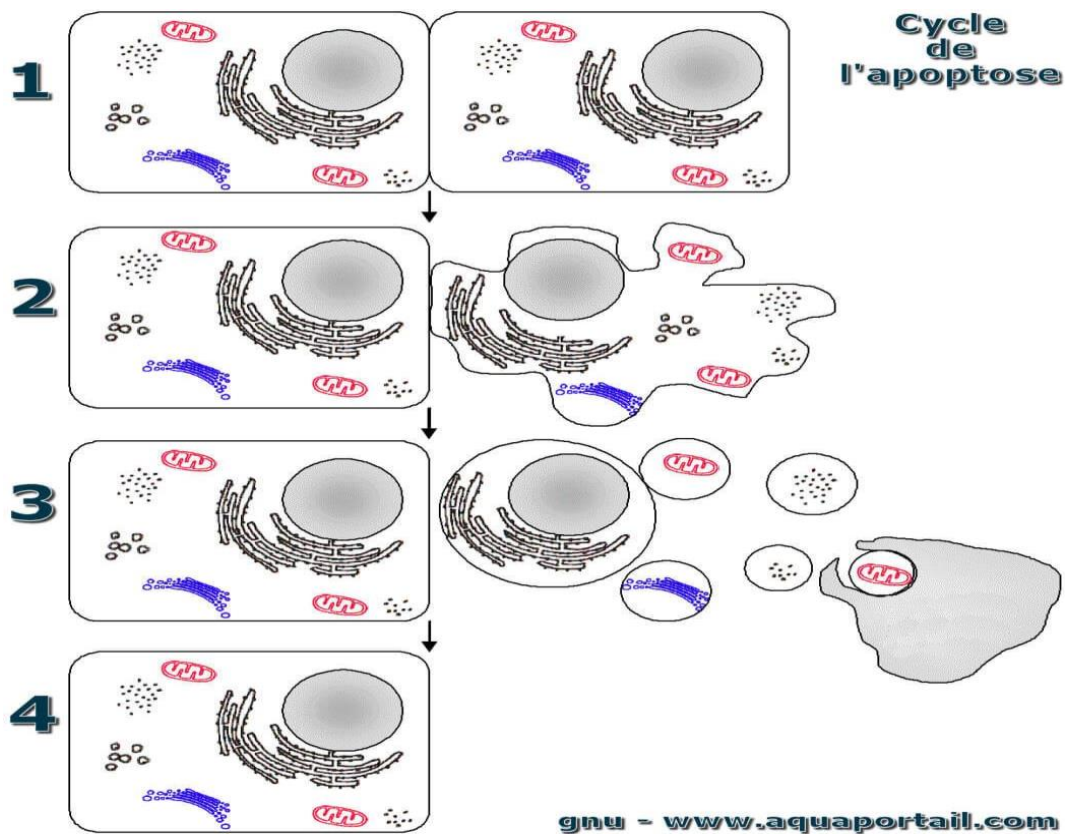
=> L'excès d'apoptose provoque des maladies dégénératives

=> Un déficit est à l'origine des processus de cancérisation, maladies infectieuses

- Élimination des cellules malades : Les cellules qui ont un défaut de fonctionnement sont éliminées. L'apoptose est un processus **onco-supresseur** très puissant.

c) Caractéristique d'une cellule apoptotique :

1. Condensation générale de la cellule (=pas de libération de contenu)
2. Condensation anormale de la chromatine
3. Fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes et noyau en forme semi-lunaire
4. Fragmentation complète de la cellule qui forme des corps apoptotiques
5. <u>Extériorisation de la phosphatidyl-sérine</u> (normalement intra-cellulaire) qui va être reconnue par les macrophages pour phagocyter la cellule <u>sans réaction inflammatoire.</u>



d) Mécanismes d'induction de l'apoptose :

Le résultat final de l'apoptose sera la **destruction** de la cellule par **protéolyse**, ce mécanisme se met en place à l'aide des caspases, il en existe deux types :

Les caspases initiatrices	Les caspases effectrices
Caspases 8,9,10	Caspases 3,6,7
Ce sont des protéases qui vont cliver les pro-caspases effectrices pour les rendre actives .	Ce sont des protéases qui vont effectuer des clivages protéiques spécifiques à l'intérieur de la cellule apoptotique .

Il faut savoir que l'apoptose peut être déclencher par 2 types de voies :

La voie intra-cellulaire: mitochondrie dépendante	La voie extra-cellulaire: mitochondrie indépendante
<ul style="list-style-type: none"> · Cette voie répond à des signaux intra-cellulaires de stress. · Mitochondrie dépendante : les mitochondries sont les réservoirs d'une hémoprotéine, le cytochrome C qui permet d'aboutir à la cascade d'activation des caspases. · Ce mécanisme passe par l'activation des protéines de la famille BCL2, certaines protéines de cette famille ayant 	<ul style="list-style-type: none"> Elle répond à des signaux extérieurs à la cellule par des récepteurs de mort appartenant à la super famille des récepteurs au TNF (Fas/CD95), Via des protéines intra-cytosoliques(FADD).

une **action pro-apoptotique**, d'autres une **action anti-apoptotique**.

Protéines de la famille BCL2 :	
Pro-apoptotique	Anti-apoptotique
BAX (cible de p53)	BCL2
BAK	BCL-X
BAD (inhibe BCL2)	

Ces protéines ont pour cible **les mitochondries**, afin que celles-ci libèrent leurs cytochromes C dans le cytosol afin de former **l'apoptosome**.

La nécrose

Définition : La nécrose correspond à une **mort cellulaire accidentelle**

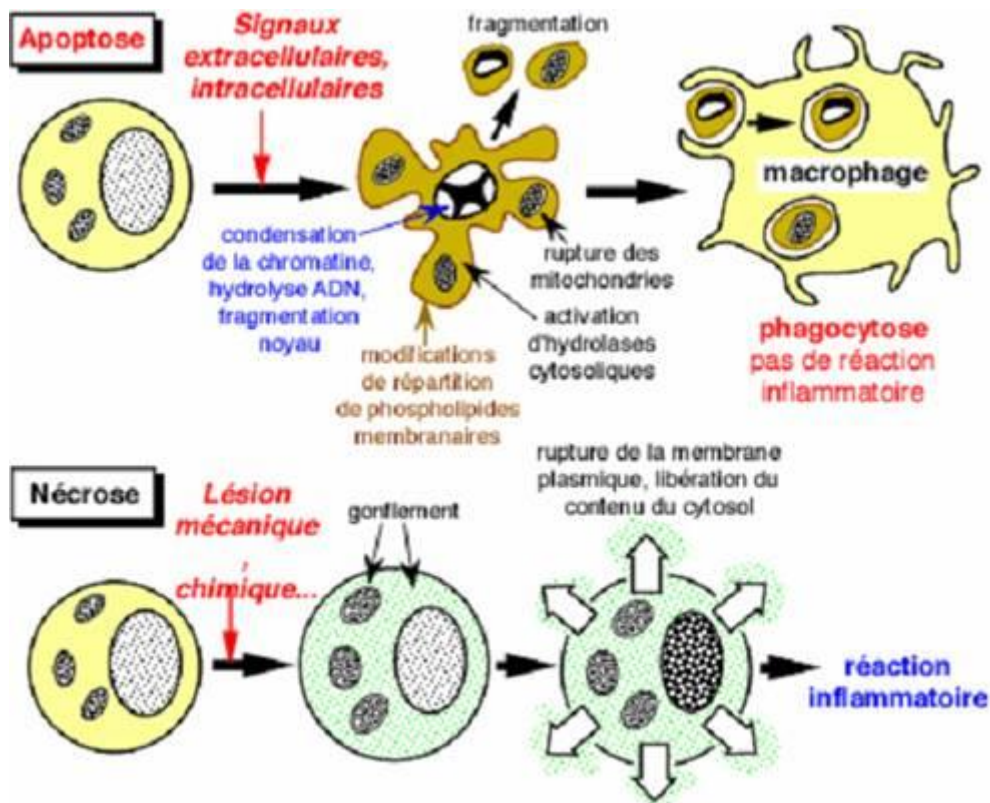
a. Caractéristiques de la nécrose :

1. physiologique ou pathologique .
2. Déclenché de manière non spécifique par des actions physique ou chimique.
3. La cellule nécrotique gonfle puis explose avec une rupture de la membrane.
4. C'est un processus ATP-indépendant .
5. Présence de réponse inflammatoire à cause du contenu des cellules qui ont explosées.
6. L'inflammation amplifie le phénomène et la nécrose touche l'ensemble du tissu aux alentours.

b) Caractéristique d'une cellule nécrosée :

- **Absence de condensation** de la cellule.
- Absence de condensation de l'ADN.
- La cellule **grossit et explose**, avec une **libération de son contenu**.
- **Libération** de la **phosphatidyl-sérine** à l'extérieur car la cellule a explosé et son contenu intérieur a été libéré.

c. Distinction entre cellules apoptotique et nécrotique :



Diverses techniques nous permettent de faire une distinction entre les cellules apoptotiques et nécrotiques tels que :

- Technique de la caspase 3
- Technique du pic Sub-G1
- Technique par double marquage

Technique de la caspase 3

- Technique par **électrophorèse** sur gel d'agarose
- On va se baser ici sur le fait qu'en **apoptose** on va avoir une **fragmentation de l'ADN** (entre les nucléosomes) et de la chromatine en général.

Petit rappel sur la cytométrie de flux :

Procédé par lequel des cellules (rendues fluorescentes (grâce à des colorants) ou pas) circulent dans un appareil qui se chargera de les analyser individuellement et de déterminer leurs états (normale, apoptose, nécrose...) en fonction de la quantité de fluorescence. On utilise principalement 2 colorants de l'ADN :

- **L'Hoechst** : Traverse la membrane **sans perméabilisation** préalable de la cellule, Colore

toutes les cellules (nécrotiques/apoptotiques/normales)

- Iodure de propidium : Nécessite que la cellule soit perméabilisée, Colore principalement les cellules nécrotiques.

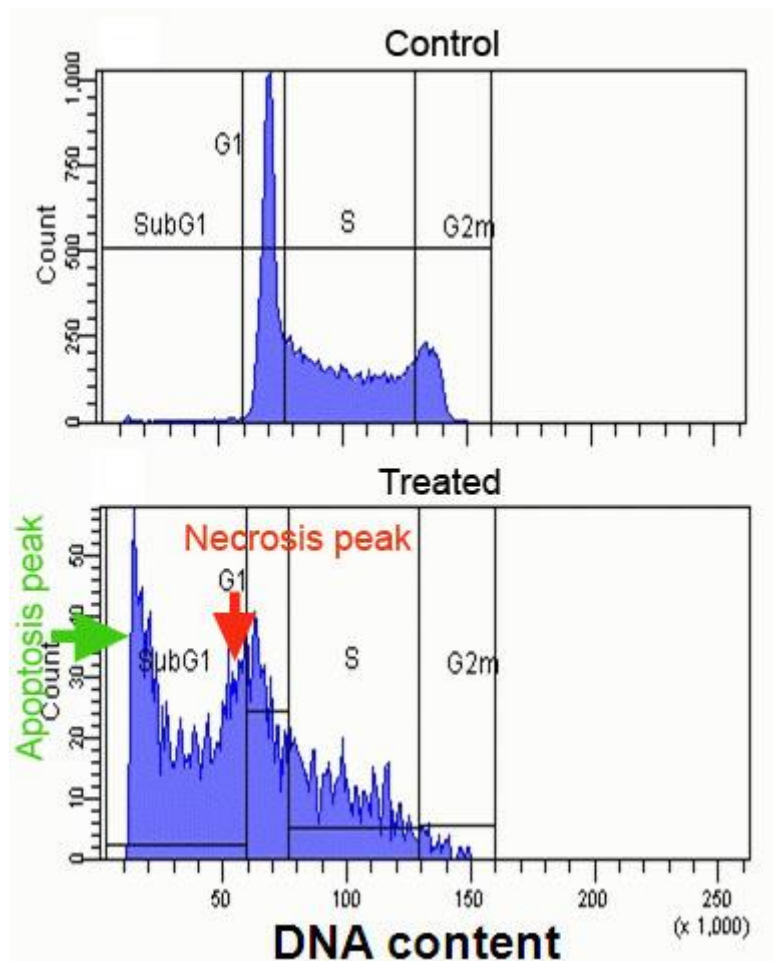
Technique du pic Sub-G1

· Technique par **cytométrie de flux**

On fixe préalablement les cellules donc elles sont perméabilisées.

· On utilise comme colorant de l'iodure de propidium

On observe un pic sub-G1 qui est caractéristique de la **fragmentation** des cellules apoptotiques et de leur noyau (la fragmentation de la cellule lors de l'apoptose entraîne la perte de certaines parties du noyau, et donc de matériel génétique, ce qui a une influence sur la quantité de fluorescence émise par la cellule).



Technique par double marquage

· Technique par **cytométrie de flux**

· On **ne fixe pas** les cellules.

- On introduit les différents colorants

Premier type de marquage	<p>On observe par cytométrie de flux, la proportion de cellule colorés à l'Hoecht et à l'iodure de propidium.</p> <p><u>Les cellules nécrotiques seront celles qui fixeront le plus d'iodure de propidium</u>, car en l'absence de fixation des cellules, du fait de la libération de leurs contenues (ADN y compris), ce sont les seules où le colorant peut se fixer sur l'ADN.</p> <p>Cependant, les deux types de cellules pourront fixer la même quantité d'Hoecht</p>
Deuxième type de marquage	<p>On utilise la spécificité de l'<u>externalisation de la phosphatidylsérine(PS)</u> lors de l'apoptose grâce à une protéine spécifique de la PS via l'annexine 5.</p> <p>Cependant le marquage reconnaît aussi bien l'apoptose que la nécrose.</p> <p>Le double marquage à l'annexine 5 et à l'iodure de propidium permet de distinguer les deux types de cellules(Apoptotique/Nécrotique).</p>

Tableau récap : <3

	HOESCHT	IODURE DE PROPIDIUM	ANNEXINE-5
NORMAL	+	-	-
NECROTIQUE	+	+	+
APOPTOTIQUES	+	-	+

Le cancer

A) Introduction

Avant de traiter les mécanismes mis en jeu dans le processus de cancérisation, il faut placer dans le contexte les deux grandes familles de gènes impliqués :

	Oncogènes	Suppresseurs de tumeurs
Physiologiquement	Absents (on a des proto-oncogènes)	Présents

Type de gènes impliqués	Gènes de la prolifération cellulaire	Gènes contrôlant la réparation des dommages à l'ADN, contrôlant le cycle cellulaire...
Mutations	Dominantes (gain de fonction)	Récessives (pertes de fonctions)
Nombre d'évènements nécessaire	Une seule mutation suffit	La mutation de deux allèles est nécessaire
Explication	La mutation provoque la surexpression des gènes de la prolifération par exemple..	

Le processus de cancérisation est une **rupture de l'équilibre** entre les oncogènes et les suppresseurs de tumeur.

Voici les caractéristiques principales acquises par une cellule normale dans la majorité des cancers :

(Cette liste n'est ni exhaustive ni chronologique).

1. Perte de la sénescence
2. Autonomie de croissance (Ex : La signalisation autocrine)
3. Contrôle anormal du cycle (Ex : La surexpression de cycline D)
4. Résistance à l'apoptose
5. Néo-angiogenèse : création de nouveaux vaisseaux sanguins « fragiles » pour les cellules cancéreuses.
6. Invasion et métastase (Sorti du tissu initial pour faire des métastase)

L'instabilité génétique va augmenter la fréquence des mutations qui pourront permettre le processus de cancérisation.

B) Caractéristiques du cancer

1. Notion de la sélection clonale

· Les cancers sont un ensemble de cellules **issues d'une seule cellule**. Ces cellules sont **hétérogènes**, au cours de la progression il y a une **acquisition de propriétés différentes**.

· Lors de l'administration d'une thérapie, on peut tuer 95% de la masse tumorale, mais si 5% des cellules ont acquis une mutation de résistance à la thérapie, la tumeur qui poussera de ces cellules-là sera bien plus **résistante**, c'est ça la notion de **sélection clonale** des tumeurs et qui explique la résistance aux thérapies des cancers.

2. Perte de la sénescence

Précédemment, on a vu que la sénescence était une **barrière** contre les phénomènes pro-oncogéniques. **La perte de la sénescence est considérée comme une caractéristique d'une cellule potentiellement tumorale.**

Cette perte de la sénescence peut être la conséquence d'une **mutation** de l'ADN causant la perte d'un gène suppresseur de tumeur ou la synthèse de la télomérase par des cellules non concernées.

Pratiquement tous les gènes suppresseurs de tumeurs favorisent la sénescence et les oncogènes la contournent.

C) Autonomie de croissance

La cellule devient **autonome**, elle décide elle-même de se diviser, perdant son interaction avec le milieu extracellulaire. Ceci peut se produire suivant différents mécanismes :

Surexpression des Facteurs de croissance et des cytokines	<ul style="list-style-type: none">• Stimulation autocrine.• La tumeur sécrète ses propres facteurs de croissance
Surexpression/sur activation du récepteur	En surexprimant des formes normales/mutées du récepteur

La médecine personnalisée c'est de voir les caractéristiques des cancers et agir en fonction des caractéristiques qui sont propres à chaque patient.

D) Résistance à l'apoptose

Les cancers ne sont pas forcément une augmentation trop importante de cellule, parfois, c'est une **accumulation** de cellule.

Plusieurs gènes sont impliqués dans la résistance à l'apoptose :

- Surexpression de Bcl-2 => Inhibition
- Inhibition de p53/Bax => Apoptosome inhibé
- Inhibition de Bad => Bcl2 actif => Inhibition

E) Néo-angiogénèse

Le processus normal de formation de vaisseaux est l'**angiogenèse**. On parle de **néo-angiogenèse** quand il s'agit de la formation de nouveaux vaisseaux **anormaux** dans les tumeurs.

Les tumeurs sont **hémorragiques** car elles détournent à leur profit des vaisseaux pour l'apport d'oxygène. Elles vont faire en sorte d'augmenter localement la concentration de vaisseaux (d'où les tumeurs hémorragiques). Ces vaisseaux sont souvent **malformés**, ils ont des trous. On peut avoir des saignements liés à leur mauvaise qualité.

· La néo-angiogenèse est un phénomène majeur et donc sert de **cible thérapeutique** très importante.

