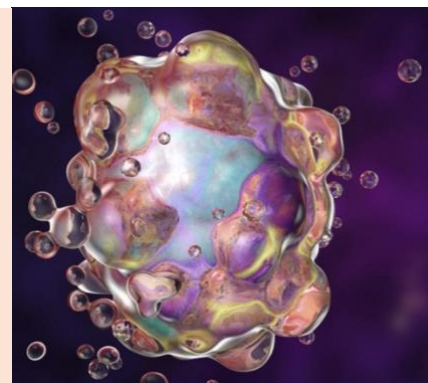


MORT CELLULAIRE



Coucou mes petites cellules, on va voir la mort cellulaire. Honnêtement il est trop cool ce cours. Une fois compris vous allez tout démonter un qcm, surtout que ça tombe souvent. Posez vous tranquille, petite boisson, petit snack et c'est parti pour la mort cellulaire 🦋

Introduction

On distingue plusieurs types de mort cellulaire. Les deux processus les plus souvent rencontrés sont l'apoptose (c'est moi Lilapoptose = Lila + apoptose vous avez capté) et la nécrose. Ce sont des processus très différents mais qui aboutissent tous les deux à la mort de la cellule.

APOPTOSE = mort cellulaire programmée (=suicide des cellules) 📖

NÉCROSE = mort cellulaire accidentelle (brûlures) 📖

I) L'apoptose, mort cellulaire programmée

A. Caractéristiques de l'apoptose

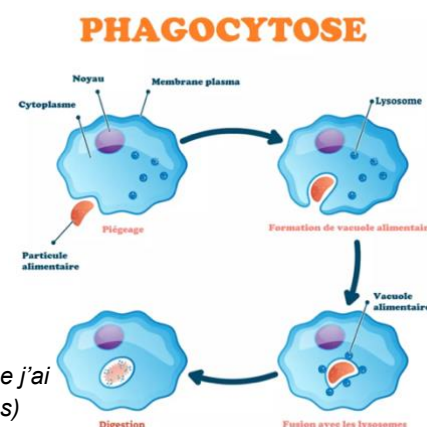
Elle est déclenchée par des signaux **extracellulaires** (absence de facteurs de croissance, infections virales...) ou **intracellulaires** (anomalie de l'ADN) qui imposent à la cellule de mourir. Ce sont des situations où il faut éliminer la cellule parce qu'elle peut être **dangereuse** ou parce qu'il faut maintenir l'**homéostasie cellulaire**.

Son déroulement est strictement contrôlé par la mise en jeu de **cascades réactionnelles particulières** et l'activation de **gènes spécifiques**.

C'est un processus **ATP dépendant** 📖 ce qui la distingue de la **nécrose** qui est un processus ATP **INDépendant**. La cellule a donc besoin d'**énergie** pour mourir.

Les débris cellulaires qui font suite à la cellule apoptotique sont éliminés de l'organisme par des **macrophages** et autres cellules **phagocytaires** par **phagocytose**.

Petit rappel sur la phagocytose pour ceux que j'ai perdu (c'est normal c'est encore les vacances)



Ceci se fait en **l'absence d'une réponse inflammatoire**, ce qui distingue également de la nécrose dans laquelle il y a une réaction inflammatoire.

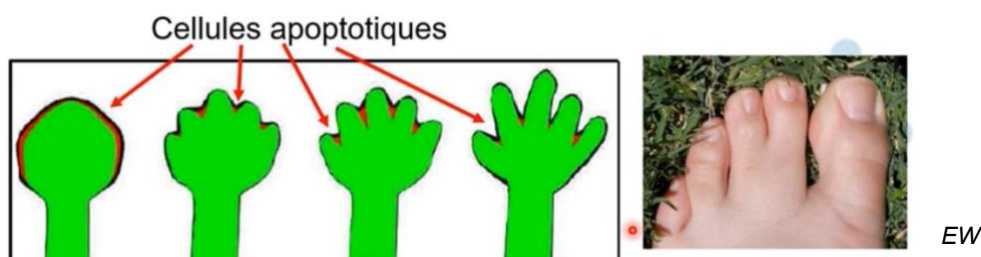
B. L'apoptose physiologique

- ⇒ L'apoptose n'est pas seulement l'élimination de cellules endommagées, c'est aussi un processus physiologique de l'organisme : l'apoptose est IN-DI-SP-EN-SABLE
- ⇒ Dans le **développement normal de l'embryon**
- ⇒ Dans **l'homéostasie cellulaire**
- ⇒ Dans **l'élimination des cellules malades**

1) L'apoptose est indispensable au développement normal de l'embryon

Lors du développement embryonnaire, l'apoptose est mise en jeu dans certains processus :

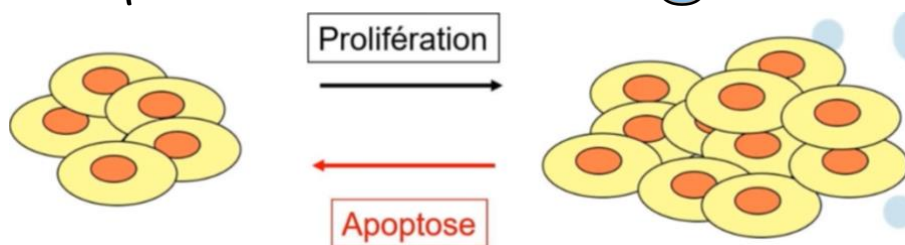
Par exemple, le modelage des **doigts par l'apoptose** des cellules entre les tissus. Ces processus peuvent être **source de malformation** s'il y a un dysfonctionnement.



Une maladie congénitale avec une apoptose incomplète qui n'a pas totalement séparé les deux orteils.

Un autre exemple est la sélection neuronale. Nos neurones subissent 2 vagues apoptotiques. Environ 50% des neurones moteurs sont détruits pendant la période périnatale. C'est une condition indispensable pour le développement normal du système nerveux.

2) L'apoptose est indispensable à l'homéostasie tissulaire



L'apoptose contribue à **l'équilibre cellulaire**. Lors de la réaction immunitaire, des clones de lymphocytes vont être capables de produire certains types d'anticorps.

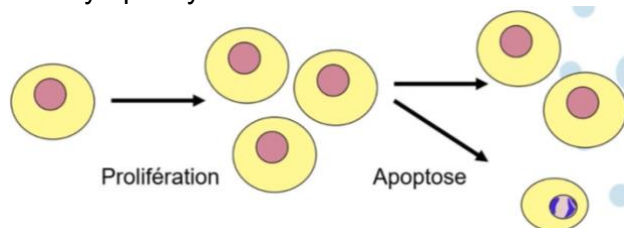
Pr. Gilson

ECUE1 : Biologie cellulaire

Lorsqu'il y'a une infection, il y aura une amplification du clone des lymphocytes nécessaires à la production de l'anticorps spécifique, ce qui va entraîner une augmentation du nombre de cellules.

Lorsque l'infection est guérie, les lymphocytes vont entrer en apoptose, ce qui va rétablir le nombre initial de cellules.

Lilapoptose



3) L'apoptose est impliquée dans l'élimination des cellules malades

Les cellules qui ont un **défaut de fonctionnement** (cancer, altérations de l'ADN ou infectées par un virus) sont éliminées par apoptose.

→ L'organisme est capable de les reconnaître et de les éliminer.

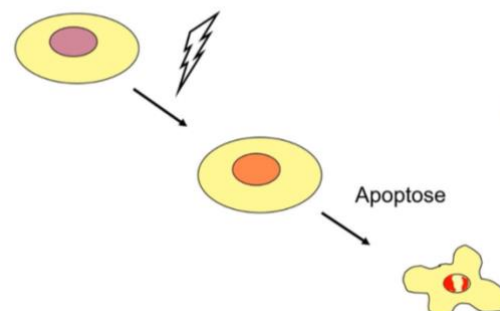
Évidemment, si ce processus ne se fait pas, la cellule cancéreuse peut devenir un cancer.

La dérégulation de l'apoptose a des conséquences majeures en pathologie : son **inhibition** est corrélée à des malformations, des maladies auto-immunes et à la cancérisation.

À l'inverse, un **excès** d'apoptose peut être responsable de maladies neurodégénératives, d'infarctus du myocarde, d'infections virales et de pathologies hépatiques.

Rôle de l'apoptose dans l'élimination des cellules malades

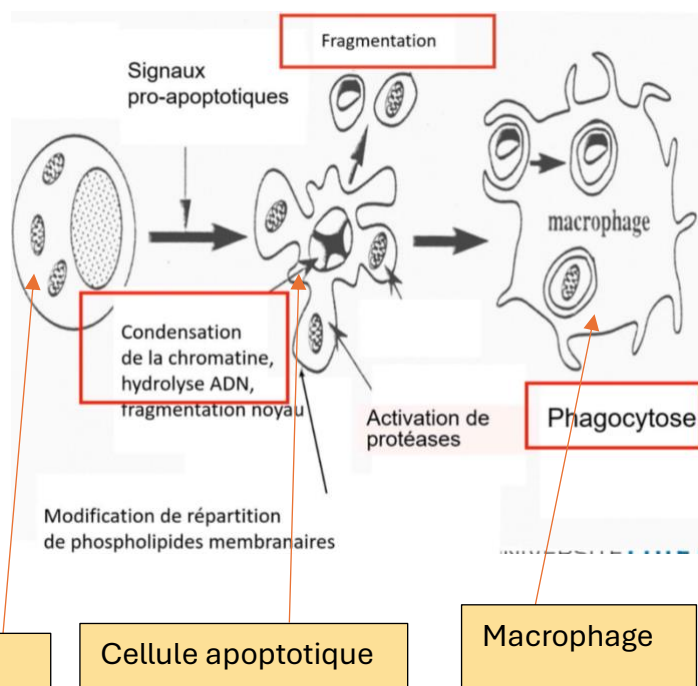
Cancer, infection virale, altération irréparable de l'ADN



C. Caractéristiques d'une cellule apoptotique

L'apoptose consiste en une série de modifications morphologiques :

- ♥ **Condensation générale** de la cellule.
- ♥ **Condensation anormale** de la **chromatine**
- ♥ **Fragmentation de l'ADN**
- ♥ Fragmentation complète de la cellule qui forme des **corps apoptotiques**
- ♥ **Phagocytose** sans réaction inflammatoire



Pr. Gilson

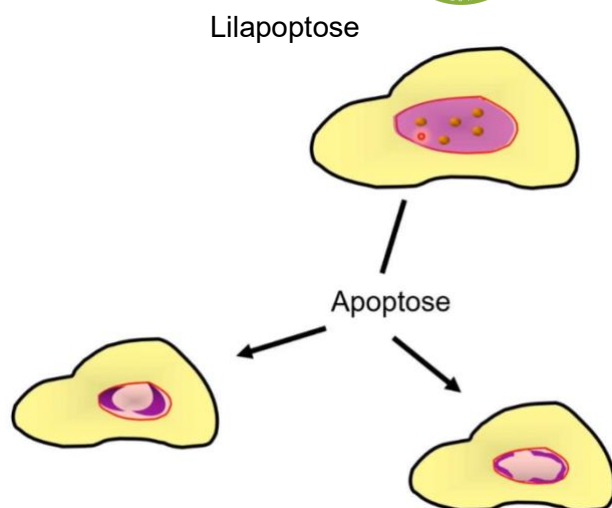
ECUE1 : Biologie cellulaire

Une des étapes de l'apoptose, c'est la **condensation de la chromatine**. On voit sur le schéma que la chromatine devient **hypercondensée** et se regroupe en **périphérie** du noyau dans les premiers stades de l'apoptose.

Description du schéma

En haut, il y a une cellule normale avec une coloration DAPI normale.

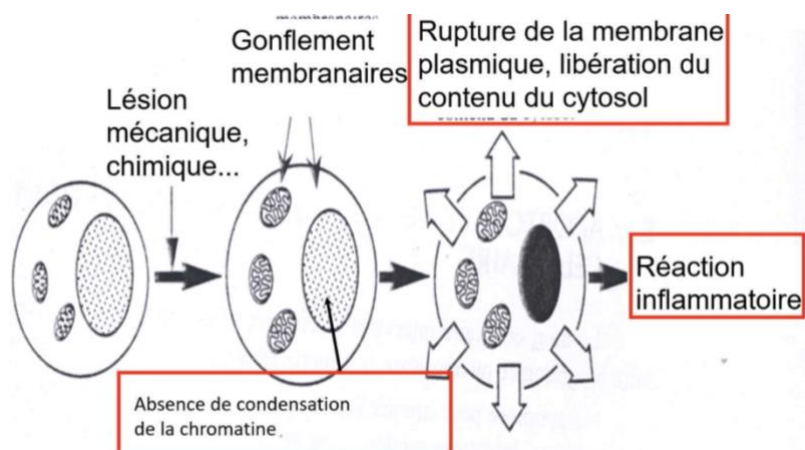
En bas, il y a deux cellules apoptotiques dont la chromatine a une forme de croissant. Cette forme est caractéristique de l'apoptose en coloration DAPI.



II) Nécrose et mort cellulaire accidentelle

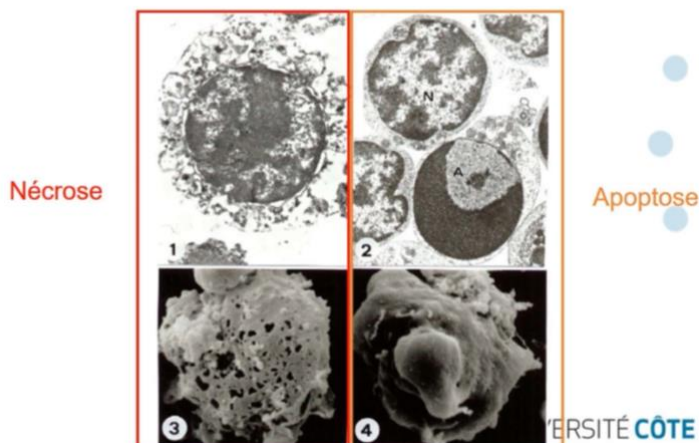
A. Caractéristiques de la nécrose

- ❖ Mort cellulaire causée essentiellement par des **atteintes physiques ou chimiques** (ischémies, brûlure, traumatisme). Elle est le résultat **des agressions sévères** subies par la cellule
- ❖ **ATP-INDÉPENDANT** contrairement à l'apoptose.
- ❖ **Explosion** de la cellule avec **rupture membranaire et réaction inflammatoire**



III) Distinction entre les cellules apoptotiques et nécrotiques

Comparaison entre cellules subissant la nécrose et l'apoptose en microscopie électronique



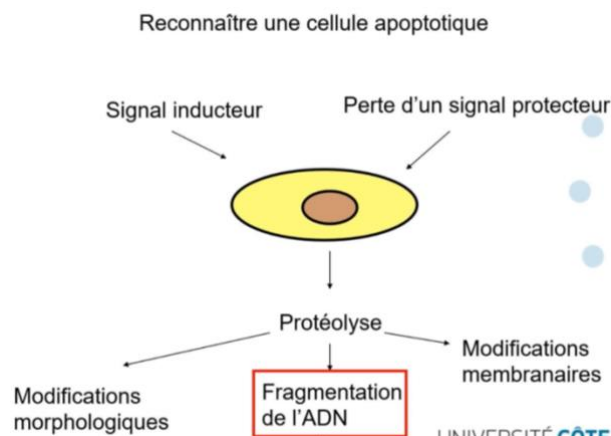
On peut visualiser sur des images de microscopie électronique. Les deux photos du haut sont en microscopie à transmission (MET). Les deux photos du bas sont en microscopie électronique à balayage (MEB).

- ⇒ Sur les photos 1 et 3 on voit : une **explosion** avec des **trous** dans la membrane = **CELLULE NÉCROTIQUE**
- ⇒ Sur les photos 2 et 4 on voit : la **condensation** de la chromatine (2) et la formation des **corps apoptotiques** = **CELLULE APOPTOTIQUE**
 - **1 ET 3 = NÉCROSE**
 - **2 ET 4 = APOPTOSE**

On va voir pleins de méthodes pour différencier les cellules apoptotiques et nécrotiques. Ça tombe pas mal en expériences à l'examen

A. Reconnaître une cellule apoptotique via la fragmentation de l'ADN

Tout à l'heure on a vu que l'une des étapes importantes de l'apoptose est la **fragmentation de l'ADN**. C'est une étape qui est donc assez facile à reconnaître et à étudier expérimentalement. Un des tests est lié à l'**activité protéolytique spécifique induite par l'apoptose**, qui va induire des modifications morphologiques, une fragmentation de l'ADN et des modifications membranaires.



1) Électrophorèse d'ADN de cellules en apoptose

Pour repérer une cellule apoptotique, nous pouvons utiliser la technique par **électrophorèse** sur gel d'agarose. On donne un poison génotoxique à la cellule en forte quantité. Le gel d'agarose permet de séparer les molécules d'ADN en fonction de leur **taille** (kB).

Nous allons ici se baser sur le fait qu'en apoptose, il va y avoir une fragmentation de l'ADN et de la chromatine en général.

On induit donc l'apoptose et on observe au cours du temps la fragmentation de l'ADN en mesurant le poids moléculaire.

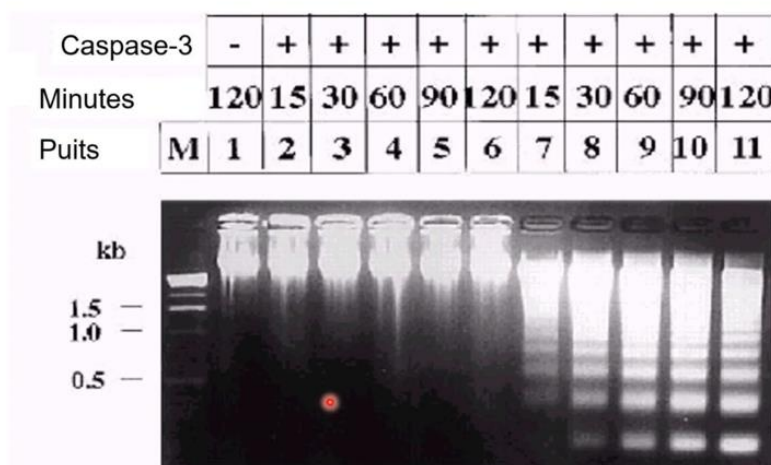
Le puits 1 nous indique que sans induction (-) de la caspase-3 au bout de 120 minutes, l'ADN n'est pas fragmenté, les cellules sont normales.

Dans les autres puits, après induction de la caspase-3, nous observons la fragmentation de l'ADN au cours du temps car le poids moléculaire diminue en plusieurs petits fragments qui représentent des nucléosomes = l'échelle de nucléosomes.

→ En gros, après avoir **induit l'apoptose** on **observe des fragments** de plus en plus petits au cours du temps sur le gel = **fragmentation de la chromatine**.

(Plus le fragment à un poids moléculaire faible, plus il ira loin sur le gel d'agarose)

Électrophorèse d'ADN de cellules en apoptose



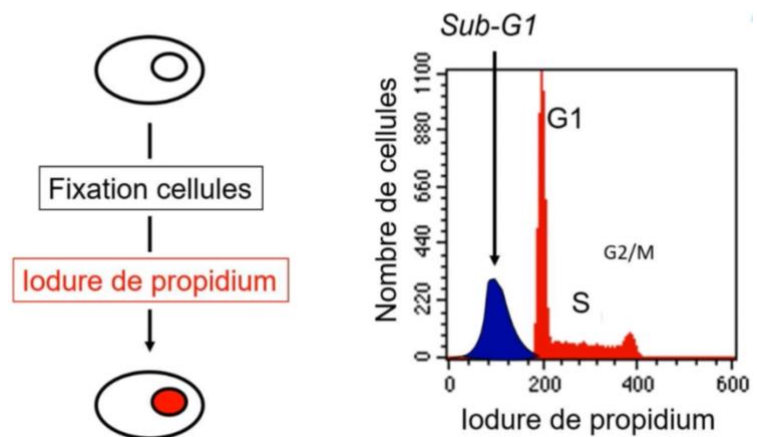
2) Technique du pic Sub-G1

Une autre façon de repérer l'apoptose, c'est par des techniques de **cytométrie**. Après fixation des cellules par marquage à l'**iodure de propidium (IP)**, cela permet de **visualiser l'ADN**.

S'il y a une apparition de cellules apoptotiques qui ont **perdu de l'ADN** du fait de la fragmentation, il y a un nouveau pic qui apparaît et qui s'appelle le **pic sub-G1** et qui signe la présence de cellules en apoptose.

Explications : On marque l'ADN avec de l'iodure de propidium (IP) en ayant perméabilisé = fixées la cellule au préalable. L'apoptose entraîne la fragmentation de l'ADN comme vous l'aurez compris. DONC => + petits corps => - d'ADN => - de fixation d'IP => - de fluorescence. Ce qui explique l'apparition d'un pic supplémentaire = pic sub-G1.

Marquage de l'ADN / Technique "sub-G1"

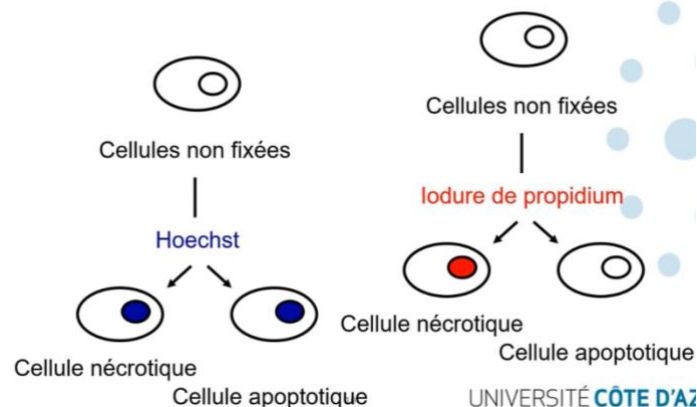


Marquage de l'ADN sur cellules apoptotiques et nécrotiques

3) Technique par double marquage

C'est une autre technique par cytométrie. Les cellules ne sont pas fixées = pas de perméabilisation. On introduit les différents colorants (double marquage)

→ **Hoechst + Iodure de propidium**



UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

HOECHST	IODURE DE PROPIDIUM
Traverse la membrane SANS perméabilisation de la cellule.	Pour que l'IP entre dans une cellule il faut que cette dernière soit PERMÉABILISÉE = avoir des trous dans sa membrane
	Les cellules apoptotiques GARDENT l'intégrité de leurs membranes = la membrane n'est pas trouée
	En revanche, on a dit que les cellules nécrotiques EXPLOSENT = membrane est trouée (L'IP peut entrer)
Colore tous types de cellules : nécrotiques, apoptotique, normales.	Donc, l'IP colore les cellules NÉCROTiques seulement

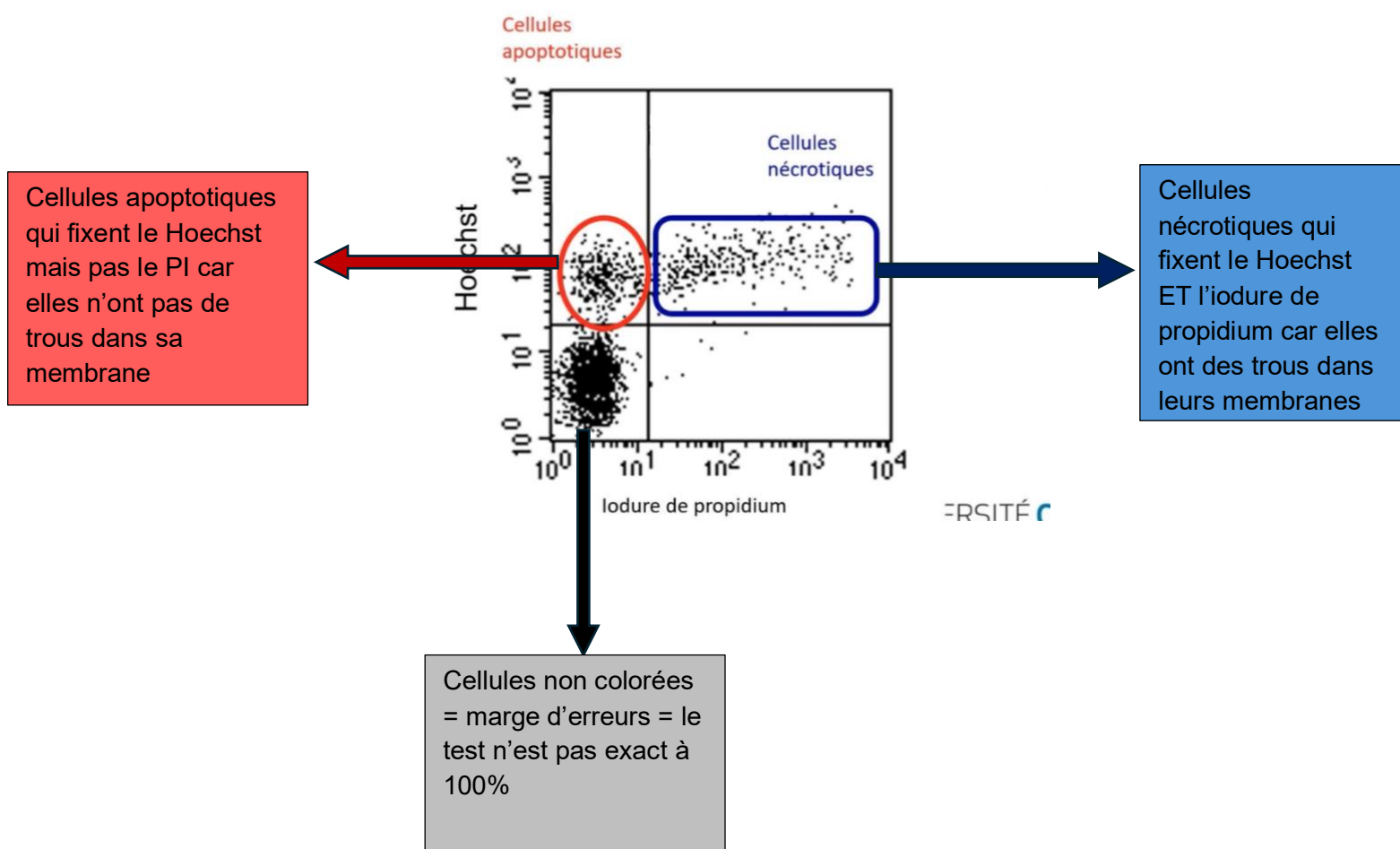
Résultats du marquage Hoechst + IP

On observe par cytométrie de flux, la proportion de cellules colorées à l'Hoechst et à l'iodure de propidium.

On sait que les cellules **nécrotiques seront celles qui fixeront le plus d'iodure de propidium** puisqu'en l'absence de fixation des cellules, ce sont les seules cellules dans lesquelles le colorant peut se fixer sur l'ADN.

Cependant, **les cellules apoptotiques et nécrotiques seront toutes les deux capables de fixer la MÊME quantité d'Hoechst.**

Marquage de l'ADN sur cellules apoptotiques et nécrotiques



HOECHST	Se repère au niveau des ordonnées. Chaque petit point représente une quantité de fluorescence. Donc plus les points sont hauts, plus il y aura de cellules colorées par l'Hoechst. ⚠ Les cellules situées en-dessous de la barre horizontale ne sont pas considérées comme colorées par l'Hoescht.
IODURE DE PROPIDIUM	Ce sont seulement les cellules nécrotiques qui peuvent être fixées puisque la membrane est perméable donc le colorant a pu pénétrer. Se repère sur l'axe des abscisses. Plus les points vont vers la droite, plus la quantité de fluorescence augmente. A gauche de la barre verticale, on considère que les cellules n'ont pas fixé l'IP

B. Reconnaître une cellule apoptotique via les modifications membranaires

Dans la cellule apoptotique, il y a aussi des modifications membranaires importantes : il existe une modification de la **symétrie membranaire** qui conduit à l'extériorisation des phosphatidylsérines.

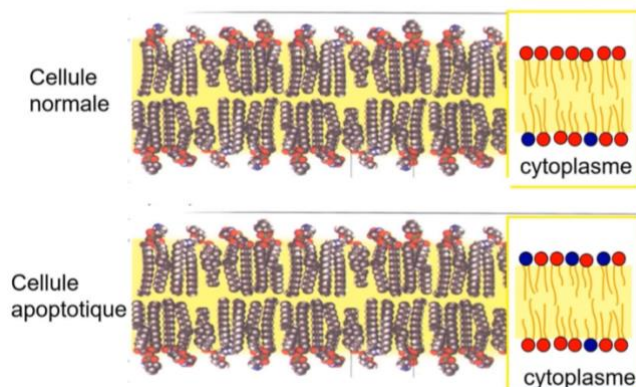
Grâce à ce phénomène les cellules apoptotiques sont reconnues par les macrophages pour être phagocytées.

En effet, un processus **actif de flip flop** (trop cute mdr) expose les **phosphatidylsérines** sur le feuillet **EXTERNE** de la membrane, contrairement aux cellules normales dans lesquelles les phosphatidylsérines sont sur le feuillet interne.

Cette propriété est utilisée en cytométrie.

Apoptotique = phosphatidylsérines EXTERNEEEEEEEES.

Modifications membranaires des cellules apoptotiques: externalisation des phosphatidylsérines



1) Double marquage Iodure de propidium + Annexine V

L'apoptose externalise sur son feuillet externe les phosphatidylsérines grâce au **flip flop**. (Comme on vient de le dire)

MAIS (il y a toujours un "mais") lors de la nécrose, la cellule explose et les phosphatidylsérines se retrouvent également externalisés !!!

Double marquage ADN- Annexine V

Il existe une protéine spécifique qui reconnaît les phosphatidylsérines, l'annexine V. On l'associe au FITC, un fluochrome.

L'annexine V va donc marquer les cellules **apoptotiques ET nécrotiques**, mais **PAS** les cellules normales.

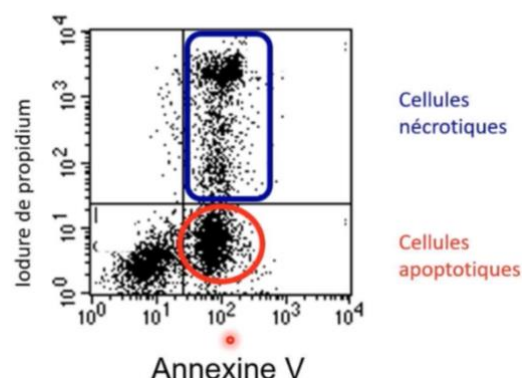
Les cellules nécrotiques vont donc fixer **l'iodure de propidium et l'annexine V**. Elles sont donc situées au dessus des DEUX BARRES (Elles fixent tout quoi, donc elles sont tout en haut)

Les cellules apoptotiques fixent **uniquement** l'annexine V. (Et pas l'iodure de propidium on se rappelle) Elles sont donc situées au-dessus du trait vertical mais en-dessous du trait horizontal.

Le double marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium permet donc de distinguer les deux types de cellules apoptotiques et nécrotiques.

RÉCAP'

	Hoechst	Iodure de propidium	Annexine V
Normales	+	-	-
Nécrotiques	+	+	+
Apoptotiques	+	-	+



C. Reconnaître une cellule apoptotique via la protéolyse

Ce qui va vraiment déclencher cette mort cellulaire par apoptose, c'est **l'activation de la protéolyse**.

La protéolyse correspond à la dégradation des protéines via d'autres protéines spécifiques



Le résultat final de l'apoptose sera la destruction de la cellule par protéolyse. Ce mécanisme se met en place à l'aide de caspases. À l'état normal de la cellule, les caspases ne sont pas actives :

Il en existe **DEUX TYPES** :

<u>Les caspases INITIATRICES</u>	<u>Les caspases EFFECTRICES</u>
<u>Caspases 8 et 10</u>	<u>Caspases 3, 6 et 7</u>
Elles sont activées par les récepteurs de mort et par auto-activation . Ce sont des protéases initiatrices 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 (PARP, I-CAD, actine, lamine etc)

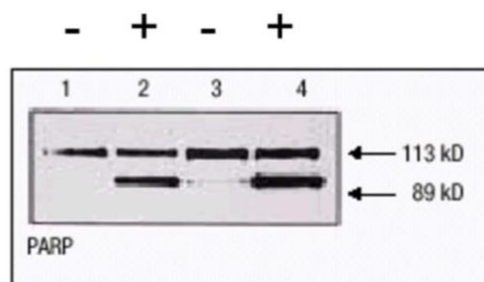
Activation des caspases et protéolyse des protéines cibles (exemple du PARP) :

Nous observons ici le clivage des protéines-clés (ici PARP impliquée dans la reconnaissance des dommages) de la cellule par les caspases effectrices.

Piste 1 et 3 : Sans l'induction des caspases effectrices (-), la protéine PARP est intacte, il n'y a eu de clivage.

Piste 2 et 4 : Avec l'induction des **caspases effectrices**, on observe deux bandes, donc il y a eu clivage de la protéine PARP. La cellule est donc **apoptotique**.

Activation des caspases et protéolyse des protéines cible

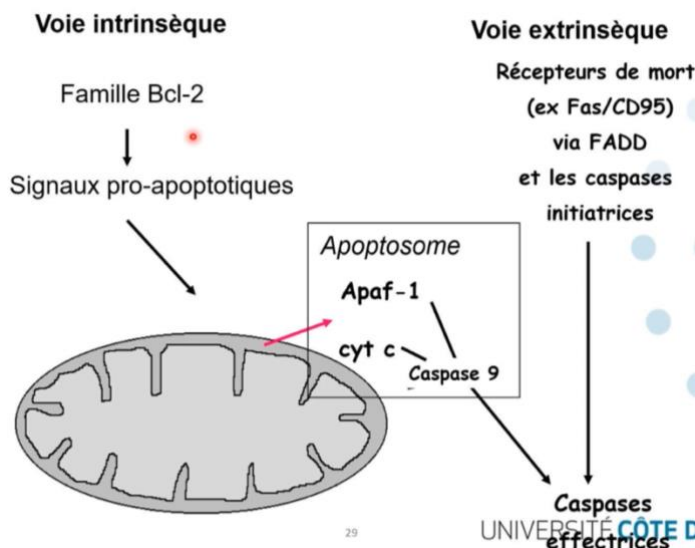


2) Le rôle des mitochondries

Les **mitochondries** sont les **usines biochimiques** de la cellule. Elles produisent la majeure partie de l'**ATP**. Elles constituent également la réserve de **cytochrome c**, une molécule essentielle dans la majorité des processus apoptotiques.

L'apoptose peut être enclenché par deux types de voie :

- ✓ Voie intrinsèque
- ✓ Voie extrinsèque

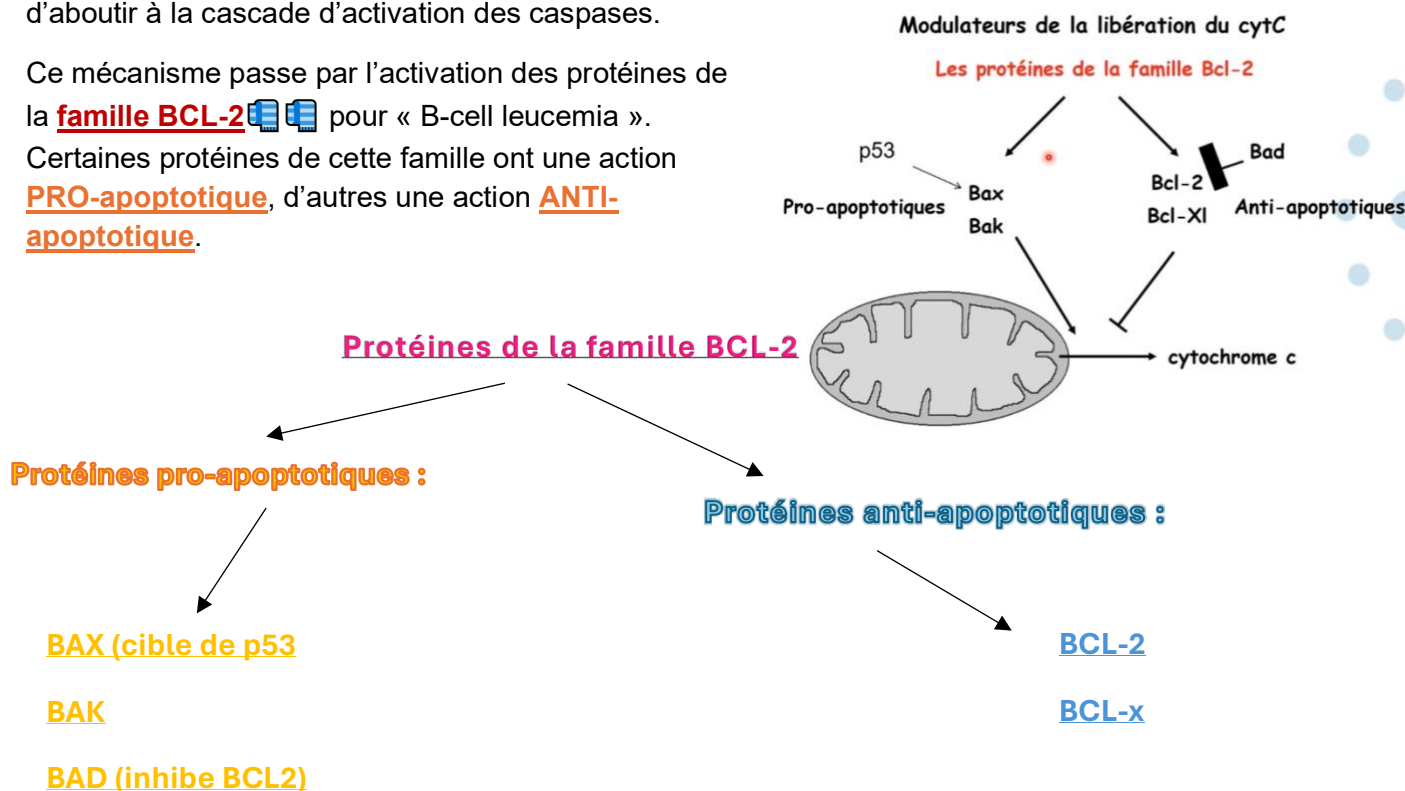


La voie intrinsèque, mitochondrie dépendante :

Cette voie répond à des **signaux intracellulaires** de stress. On dit que cette voie est **mitochondrie dépendante** car 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 BCL-2** pour « B-cell leukemia ».

Certaines protéines de cette famille ont une action **PRO-apoptotique**, d'autres une action **ANTI-apoptotique**.



Ces protéines ont pour cible les mitochondries en rendant leur membrane **plus perméable**, afin que celle-ci libèrent leurs **cytochromes C** dans le cytosol afin de former **l'apoptosome** (=complexe pro-apoptotique composé de cytochrome C et d'APAF1)

⇒ **APOPTOSOME = APAF1 + cyt c**

L'apoptosome activera ensuite une **caspase initiateur** qui activera une **caspase effectrice**.

→ Cela provoquera la fragmentation de la chromatine, la lamine, le cytosquelette...

La libération de cytochrome C est sous le contrôle des membres de la famille BCL2.

La voie extrasèque, mitochondrie indépendante

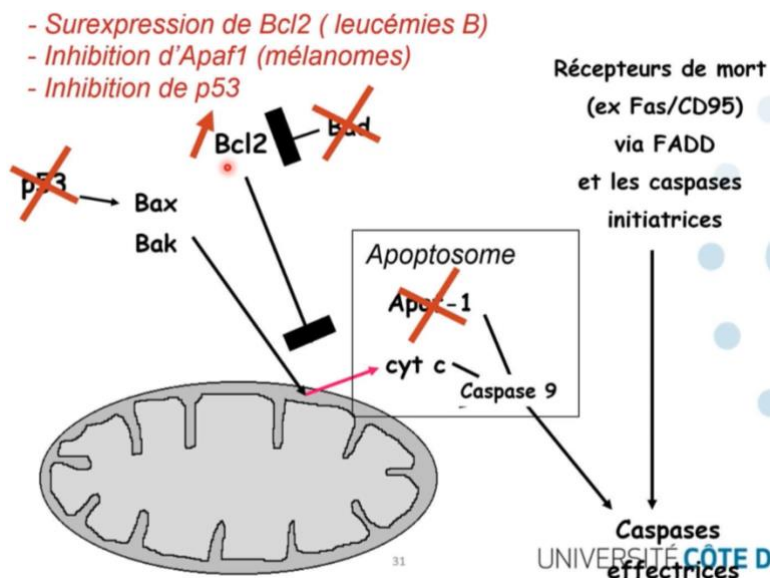
Elle répond à des **signaux extérieurs** à la cellule par des **récepteurs de mort** appartenant à la super famille des récepteurs au **TNF** (Fas/CD95) via des protéines intra-cytosol issues (FADD)

Ces protéines vont cliver les **caspases initiateurs**, puis **caspases effectrices**.

→ Cela provoquera la fragmentation de la chromatine, la lamine, l'actine du cytosquelette...

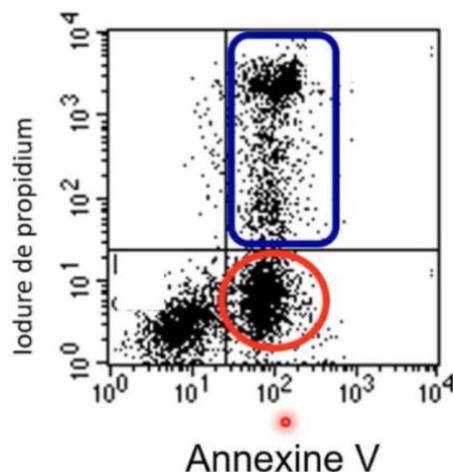
Pathologies : Dans les cas de cancer, les mécanismes de l'apoptose sont défectueux. En effet, l'apoptose étant limitée, on va avoir une **prolifération de cellules défectueuses** au processus cancéreux. On peut avoir par exemple :

- ❖ Surexpression de protéines anti-apoptotiques (BCL) : leucémie B
- ❖ Inhibition de l'apoptosome
- ❖ Inhibition d'APAF-1 : mélanomes
- ❖ Inhibition de p53



QCMMMMM

A propos de la mort cellulaire, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s) :



- A) L'iodure de propidium est un marqueur des cellules nécrotiques et apoptotiques
- B) Les cellules dans la fenêtre rouge se condensent sous forme de croissant de chromatine
- C) L'annexine V reconnaît les phosphatidylsérines extériorisées lors du processus de flip flop des cellules apoptotiques
- D) Les cellules dans la fenêtre bleue fragmentent leur ADN
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Correction après les dédis

Dédi à TOI qui lis cette fiche, bravo d'avoir tenu jusqu'ici !!

Dédi à Jurassic Park et à la TTR

Dédi à ma maman qui est aussi ma meilleure amie, qui me manque quand je pars mais avec qui je passe toujours des bons moments quand je reviens

Dédi à mon papa pour être le plus drôle et le plus cool de tous les papas #monpèreestunswiftie

Dédi à mes co-tuts qui sont super fiables et avec qui je vais passer une super année ensemble

Dédi à mes vieux Houcine, Hugo et JP qui nous soutiennent dans cette aventure au cœur de la cellule

Dédi à mes copines en médecine à nous la p2 !!!!!

Dédi aux nouveaux las2 courage, vous êtes les plus forts et les plus motivés, VOUS MÉRITEZ !

Dédi à mes amis à Hyères, vous êtes les meilleurs

A : faux -> seulement nécrotiques ; B : vrai ; C : EXTériorisées ; D : fenêtre bleue = cellules nécrotiques