

I INTRODUCTION

A. DEFINITIONS GENERALE

⇒ Ce sont des mécanismes de réponse au stress, qui équivaut à une rupture de l'**homéostasie**.

Homéostasie : Capacité de la cellule à maintenir ses constantes en équilibre autour d'une certaine valeur, malgré les influences du milieu extérieur.

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

Quiescence	Arrêt transitoire de son cycle cellulaire	Métaboliquement active
Senescence	Arrêt permanant de son cycle cellulaire	Métaboliquement active
Apoptose	Stress trop grand => Mort programmée	Métaboliquement inactive

B. LES MARQUEURS

⇒ Les marqueurs permettant de différencier ces différents états :

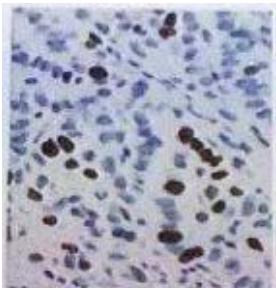
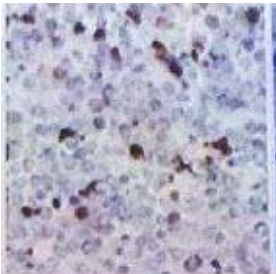

Aparté sur les différents types de marqueur :

Marqueur **Absolu** : Résultat (+) pour un facteur reflétant un unique processus

= **DEMONTRE UN PHENOMENE**

Marqueur **Relatif** : Résultat (+) pour un facteur reflétant plusieurs processus

= **SUGGERE UN PHENOMENE**



Etats	Mitotique	Apoptotique	Sénescent
Marqueur	Ki67 	Caspase3 	SAβGal 
Type	Absolu	Absolu	Relatif

Précision	<p>Le marquage positif au Ki67 rend les cellules foncées.</p> <p>Ce marqueur absolu DEMONTRE que ces cellules sont en train de se diviser.</p>	<p>Le marquage positif à la caspase3 rend les cellules foncées</p> <div> <p><u>NB</u> : La caspase 3 est libérée dans le cytosol lorsque la cellule entre en apoptose, (Cf chapitre sur la mort cellulaire)</p> </div> <p>Ce marqueur absolu DEMONTRE que ces cellules sont en train de mourir.</p>	<p>Le marquage positif à la SA-β-galactosidase est caractérisé par une coloration bleue des cellules.</p> <div> <p><u>NB</u> : On utilise du X-Gal (substrat de l'enzyme β-Galactosidase) quand il y a une activité βGal, il est dégradé et les cellules sont bleues.</p> </div> <p>MAIS ce marqueur peut aussi bien représenter une augmentation de l'activité lysosomiale physiologique, que la senescence de ces cellules.</p> <p>Ce marqueur relatif SUGGERE que ces cellules sont sénescents.</p>
-----------	---	--	--

II SENESCENCE CELLULAIRE

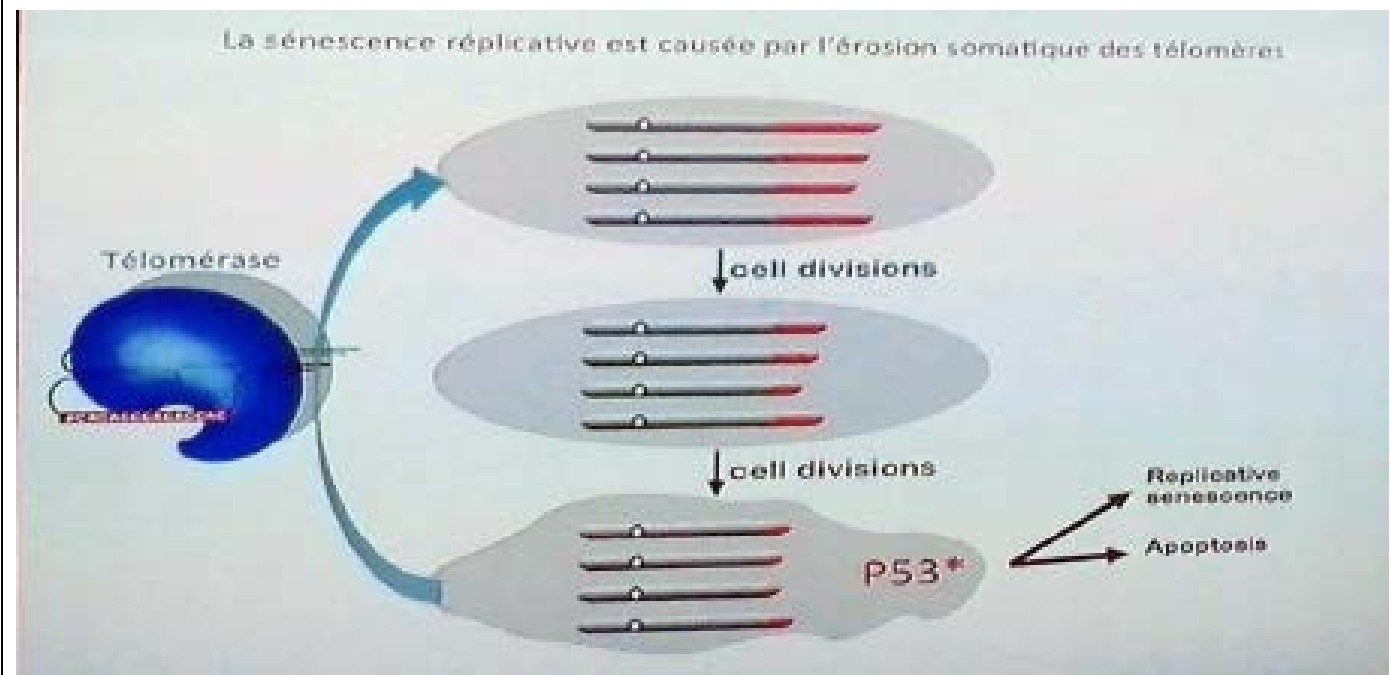
A. PETIT HISTORIQUE

⇒ Au cours de l'histoire, différents dogmes se sont succédés sur la durée de vie d'une cellule ;

 Période 	Définition	Mode de pensée
Dogme de l'époque, avant l'expérience de <i>Léonard Hayflick</i> .		<ul style="list-style-type: none"> Les cellules en culture peuvent se diviser infiniment Les cellules ne sont pas soumises au vieillissement
Après l'expérience sur de jeunes fibroblastes, par <i>Léonard Hayflick</i> (1960)	On parle d'âge réplcatif (ou limite d'Hayflick)	<ul style="list-style-type: none"> Une cellule arrête de se diviser au bout d'un certains nombres de divisions (environ 50) Les cellules gardent en mémoire le nombre de divisions qu'elles ont déjà effectuées indépendamment du temps = potentiel prolifératif

B. CAUSES DE LA SENESCENCE

1. La sénescence répllicative



- Les extrémités chromosomiques des cellules de l'organisme qui ne possèdent pas l'équipement enzymatique nécessaire (=télomérase, présente dans certaines cellules souches et germinales) s'érodent au fur et à mesure des divisions.
- A partir d'un certain nombre de division, le raccourcissement des télomères devient critique 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.

2. Le stress oncogénique

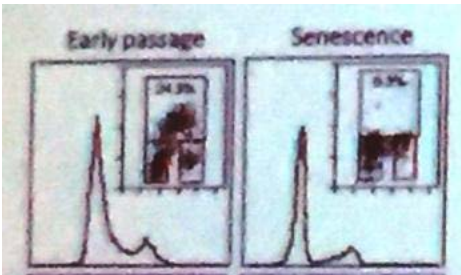
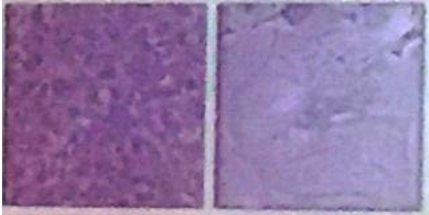
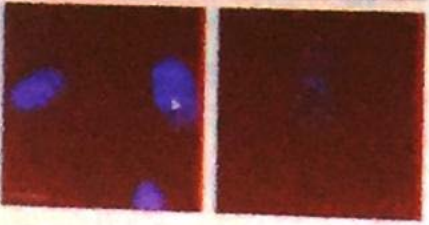

- Lors de la mutation de la **protéine RAS**, mutant gain de fonction, il y a une activation supra-physiologique de la voie de signalisation contrôlant le cycle cellulaire (voie des MAP-kinases), la cellule se met à se diviser de manière aberrante.
- La vitesse de division importante **cause** des défauts de réplication de l'ADN.
#PasêtretrorapidesurlesQCM #défautsderéponses
- Les dommages à l'ADN aboutissent à l'activation de la **protéine P53** qui déclenche la sénescence.

3. Sénescence prématurée

- Différents mécanismes vont agir sur les **voies de signalisation** de dommages cellulaires (augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène/ irradiations/ carences (énergétique, nutriments, facteurs de croissance, absence de signaux) / mauvais contact cellulaire(MEC))
- Ces mécanismes induisent un stress **insurmontable** pour la cellule, qui entre en sénescence voir en apoptose

C. CARACTERISTIQUES DE LA SENESCENCE

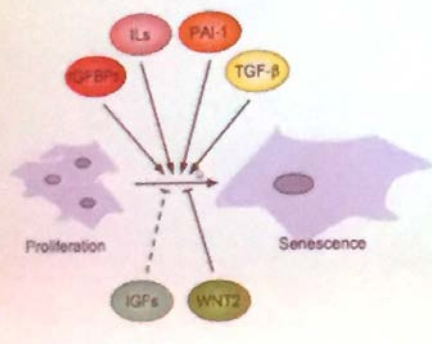
⇒ D'un point de vue cellulaire, on définit la sénescence par **une combinaison de caractéristiques** car au niveau de la sénescence, ces caractéristiques **ne sont pas forcément spécifiques**, c'est donc mieux de corréler plusieurs marquages afin d'être sûr de l'état dans lequel est la cellule.

1. Caractéristiques intra-cellulaires		
<u>Arrêt de la Prolifération</u>		<ul style="list-style-type: none"> Cet arrêt de prolifération fait qu'on peut facilement savoir s'il y a des cellules sénescents dans une culture en faisant une <u>cyrtométrie de flux</u> → A gauche, on voit le pic de cellules en G1 et G2 et entre les deux des cellules en S → A droite, on s'aperçoit qu'il n'y a plus de cellules en phase S, il n'y a plus de réplication de l'ADN, elles sont arrêtées en G1, les cellules sont en senescences.
<u>Morphologie</u>		<ul style="list-style-type: none"> Les cellules sénescents sont des cellules aplaties, plus larges, aspect d'œuf au plat, difficilement repérable car le contour est <u>peu réfringent</u>
<u>Noyau</u>		<ul style="list-style-type: none"> On voit l'apparition de foyers d'hétérochromatine à la <u>coloration au DAPI</u> dans les cellules sénescents, il y a une concentration de chromatine très importante.
<u>Altération de l'activité β-Galactosidase</u>		<ul style="list-style-type: none"> Normalement on ne détecte pas cette activité lysosomale, sauf si la cellule est en sénescence.
<u>Test en laboratoire</u>		<ul style="list-style-type: none"> 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 (kinase ATM phosphorylés, variant histone H2AX, l'activation de p53)
<u>Apoptose</u>		<ul style="list-style-type: none"> Résistance à l'apoptose

2. Caractéristiques extra-cellulaires

Sécrétion de facteurs spécifiques (ou SASP pour Senescence Associated Secretion Profile)

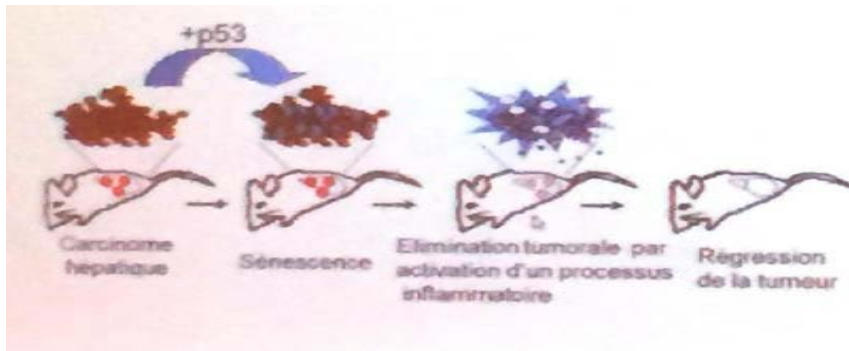
Les facteurs du SASP peuvent moduler la sénescence



- Ces facteurs sont libérés de manière **endocrine(sang)/paracrine(MEC)** lors d'un traumatisme par les cellules sénescents autour des tissus nécrosés
- Ils sont majoritairement des **facteurs pro-inflammatoires** (Interleukine, prostaglandine) ainsi que des **enzymes de remodelage tissulaire/facteurs de croissance**
- Cette inflammation locale est **ambivalente**.
 - ➔ **Courte durée** : Les cellules aux alentours vont libérer leurs facteurs spécifiques, afin de recruter les cellules de l'immunité et favoriser la cicatrisation.
 - ➔ **Longue durée** : Si un grand nombre de cellules sénescents persistent, cette inflammation va être responsable du phénomène de vieillissement.

D. DEVENIR DES CELLULES SCENESCENTES

Expérience relatant du phénomène :



Modèle : On prend pour modèle un **hépatocarcinome (cancer du foie)** chez la souris qui est caractérisé par l'absence de gène p53.

Hypothèse : La réactivation de **p53 arrêterait** la prolifération de la tumeur

Objectif : restaurer **p53** par manipulation génétique

Résultats : Après **réactivation** de **p53**, ils se sont aperçus que la tumeur avait **régressé**.

Hypothèse 2 : Les chercheurs pensaient alors que les cellules étaient entrées en **apoptose**.

Résultats 2 : Pour le prouver, ils ont décidé de faire un marquage à la **caspase 3**, qui s'est avéré **négatif**.

Hypothèse 3 : Ils ont décidé de rechercher la sénescence des cellules tumorales en faisant la **coloration de la bêta-Galactosidase acide** pour rechercher une marque de la sénescence.

Résultats 3 : Ils ont bien observé que les cellules de la tumeur étaient entrées en **sénescence**.

=>Cependant, comment la tumeur a réduit de volume si les cellules étaient uniquement entrées en sénescence et étaient donc encore vivante. En fait ces **cellules sénescents** par réactivation de p53 ont été **éliminées par le système immunitaire**

Hypothèse 4 : L'inactivation des gènes codant pour les cellules immunitaires conserveraient les cellules sénescents.

Résultats 4 : Ils démontrèrent que les cellules sénescents étaient phagocytées par l'immunité.

Conclusion :

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

E. LA SÉNESCENCE ET LE VIEILLISSEMENT

Expérience relatant du phénomène :

Objectif : Démontrer que les cellules sénescents **favorisent** les pathologies liées au vieillissement.

Méthode : L'introduction dans des cellules de souris d'un gène suicide sur le promoteur du gène codant pour la protéine **P16**, qui est **un effecteur** de la sénescence. De cette manière, à chaque fois qu'une cellule entrera en sénescence (ce qui se manifestera par l'activation du promoteur de P16) la cellule **mourra**, car le gène suicide sera lui aussi activé.

Résultat : Les souris dénuées de cellules sénescents vivent **plus longtemps** et en **meilleure** santé que les souris « contrôles » sauvages. En effet l'incidence des maladies liées à l'âge à l'exception des maladies neurodégénérative **diminue** pour les cellules dénuées de cellules sénescents.

La recherche contre le vieillissement se tourne désormais vers l'élimination de ces cellules.

- **Conclusion :** La sénescence a **des effets bénéfiques** pour la protection contre certains cancers et la réparation tissulaire **cependant** le problème majeur est la **persistance** de cellules sénescents dans les tissus sur le long terme.

III **MORT CELLULAIRE**

- Il existe deux types de mort cellulaire très différentes : **L'apoptose** et la **nécrose**.

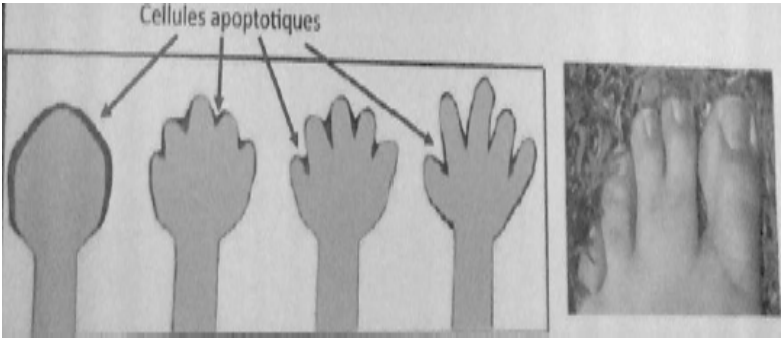
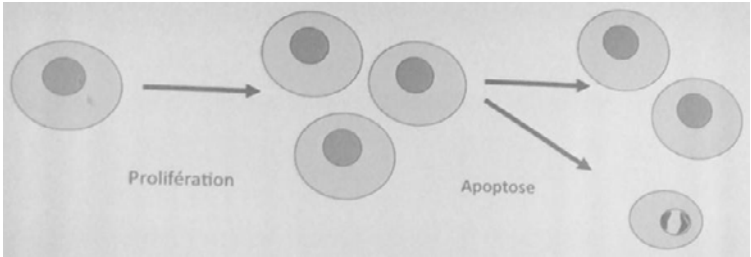
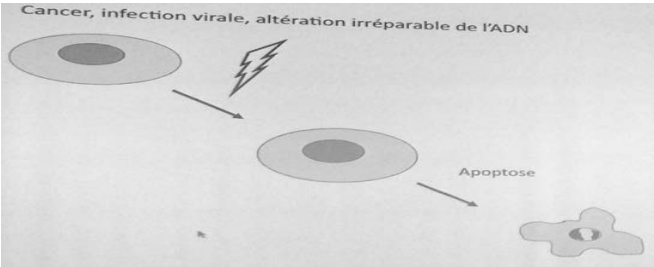
A. L'APOPTOSE

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

1. CARACTERISTIQUES DE L'APOPTOSE

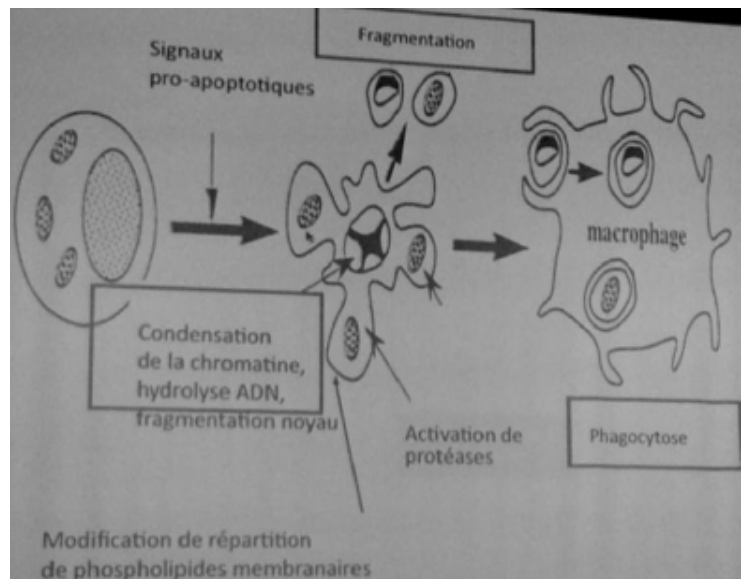
1. Peut-être physiologique ou pathologique
2. Déclenché de manière contrôlée par des signaux intra ou extra-cellulaire
3. Contrôlée par la mise en place de cascades réactionnelles et l'activation de gènes spécifiques
4. C'est un processus ATP-dépendant
5. Absence de réponse inflammatoire, les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose

2. L'APOPTOSE EN PHYSIOLOGIE

<p><u>Embryogénèse</u></p>	<p>Lors du développement embryonnaire, il y a l'apoptose qui est mise en jeu dans certains processus :</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Le modelage des doigts par l'apoptose des cellules entre les tissus ⇒ Le remodelage du nombre de neurone dans le cerveau <p>Ces processus peuvent être source de malformation s'il y a un dysfonctionnement.</p>	
<p><u>Homéostasie tissulaire</u></p>	<p>L'apoptose contribue à l'équilibre cellulaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ L'excès d'apoptose provoque des maladies dégénératives ⇒ Un déficit est à l'origine des processus de cancérisation, maladies infectieuses 	
<p><u>Élimination des cellules malades</u></p>	<p>Les cellules qui ont un défaut de fonctionnement sont éliminés. L'apoptose est un processus onco-supresseur très puissant.</p>	

3. CARACTERISTIQUES 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 et noyau en forme semi-lunaire
4. Fragmentation complète de la cellule qui forme des corps apoptotiques
5. Extériorisation de la phosphatidyl-sérine (normalement intra-cellulaire) qui va être reconnue par les macrophages pour phagocyter la cellule sans réaction inflammatoire.

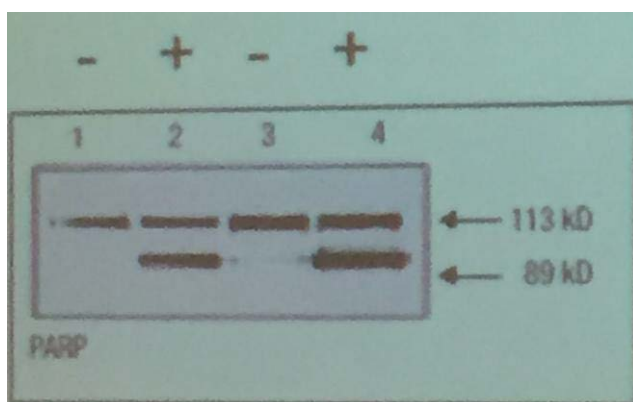


4. MECANISMES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE

- 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 .

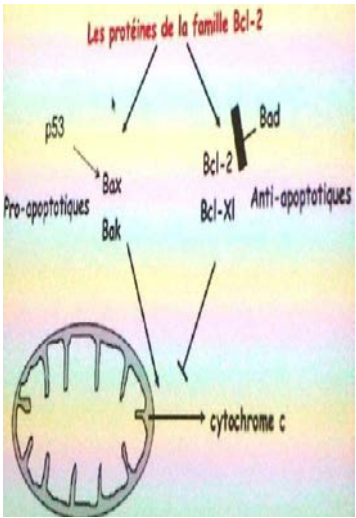
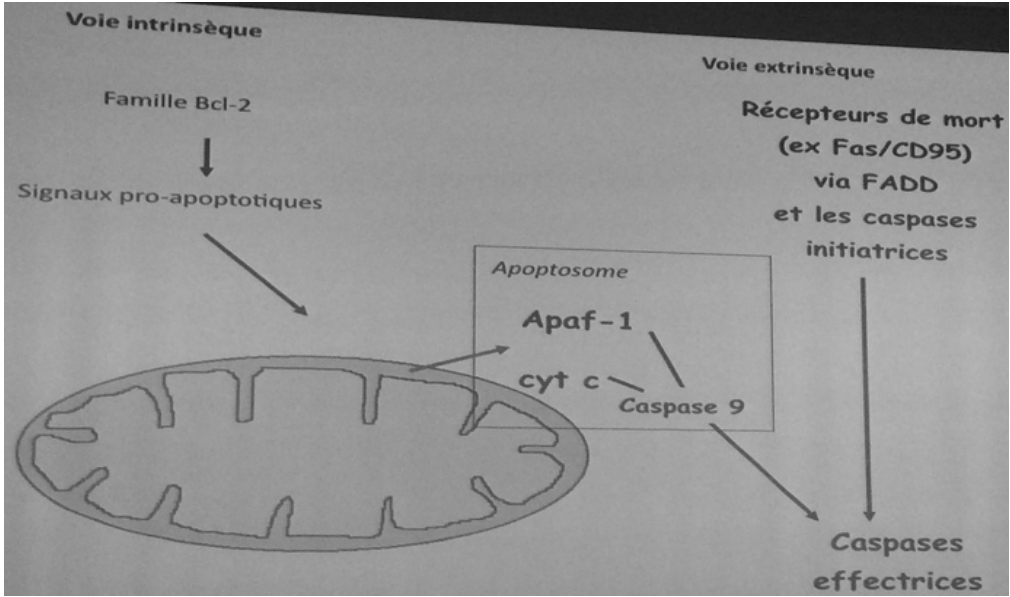
Expérience relatant du phénomène :



En gel de polyacrilamide sds, on observe le **clivage** des protéines-clés (ex :PARP) 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 pas 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 = **Apoptose**.

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

Voie intra-cellulaire (mitochondrie dépendante)	Voie extra-cellulaire (mitochondrie indépendante)										
<ul style="list-style-type: none"> ○ Cette voie répond à des signaux intra-cellulaire de stress. ○ On dit que cette voie est mitochondrie dépendante car les mitochondries sont le 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 une action pro-apoptotique , d'autres une action anti-apoptotique. <table border="1" data-bbox="68 633 1069 866"> <thead> <tr> <th colspan="2">Protéines de la famille BCL2</th></tr> <tr> <th>Pro-apoptotique</th><th>Anti-apoptotique</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BAX</td><td>BCL2</td></tr> <tr> <td>BAK</td><td>BCL-X</td></tr> <tr> <td>BAD (inhibe BCL2)</td><td></td></tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> ○ Ces protéines ont pour cible les mitochondries, afin que celles-ci libèrent leurs cytochromes C dans le cytosol afin de former l'apoptosome (complexe pro-apoptotique composé de cytochrome C et d'APAF1). <p><i>Celui-ci activera ensuite la caspase 9 initiateur... caspase effectrice..etc</i></p>	Protéines de la famille BCL2		Pro-apoptotique	Anti-apoptotique	BAX	BCL2	BAK	BCL-X	BAD (inhibe BCL2)		<p>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).</p> <p><i>Ces protéines vont activer les caspases initiateurs.. caspase effectrice...ect</i></p>
Protéines de la famille BCL2											
Pro-apoptotique	Anti-apoptotique										
BAX	BCL2										
BAK	BCL-X										
BAD (inhibe BCL2)											
											

B. LA NECROSE

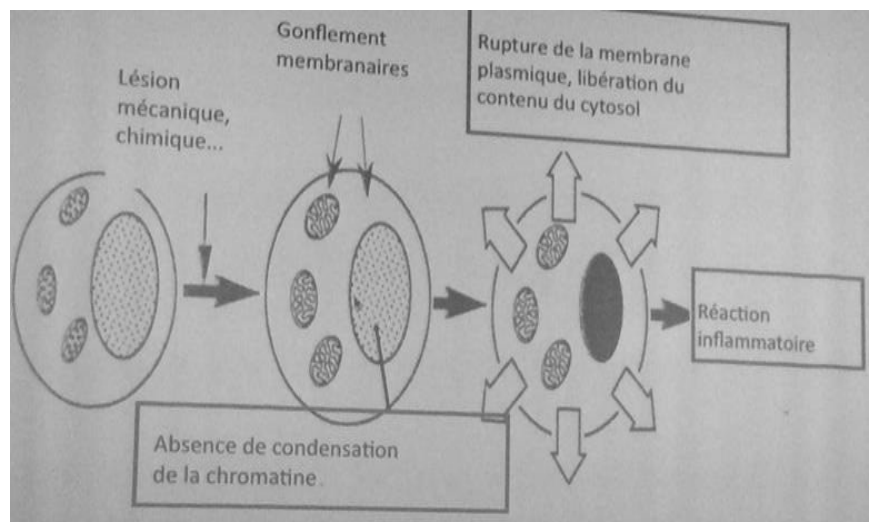
Définition : La nécrose correspond à une mort cellulaire accidentelle.

1. CARACTERISTIQUES DE LA NECROSE

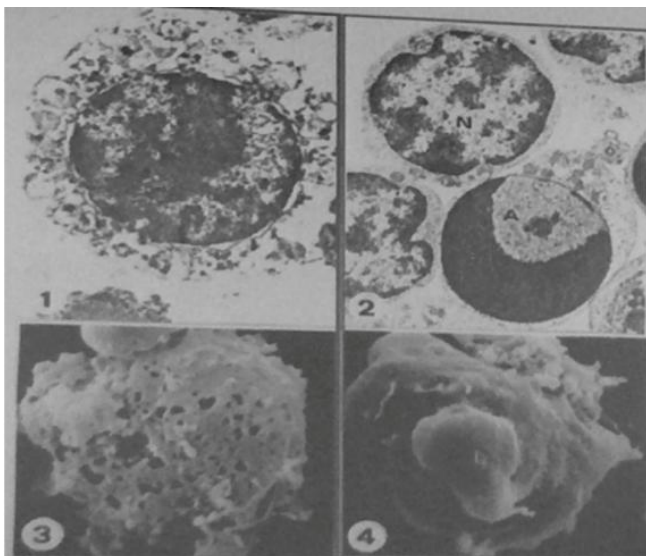
1. Peut-être physiologique ou pathologique .
2. Déclenché de manière non spécifique par des actions physique ou chimique.
3. La cellule nécrotique gonfle puis explose avec une rupture de la membrane.
4. C'est un processus ATP-indépendant .
5. Présence de réponse inflammatoire à cause du contenu des cellules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

2. CARACTERISTIQUES D'UNE CELLULE NECROTIQUE

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



C. DISTINCTION ENTRE CELLULE APOPTOTIQUE/NECROTIQUE



Photos 1 et 3 : Nécrose (microscopie électronique / microscopie à balayage)

Photos 2 et 4 : Apoptose (N pour normale, A pour apoptotique).

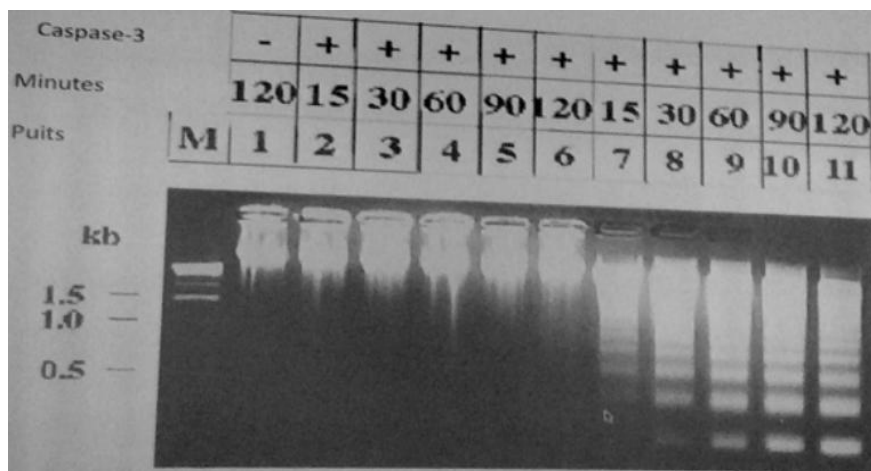
On voit cette fragmentation de la membrane plasmique de la cellule nécrotique, alors qu'on voit un croissant très dense aux électrons (*caractéristique de la chromatine condensée*) chez la cellule apoptotique (2A).

- Pour différencier ces différents états cellulaires, on va se servir des différentes propriétés caractérisant chaque mécanisme, que l'on a vu ci-dessus.

1. 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 et de la chromatine en général.
- La **caspase 3** est mise en jeu dans l'apoptose.

On induit ou non l'**apoptose** avec cette caspase 3 et on observe **au cours du temps** la fragmentation de l'ADN pour **différencier** les cellules normales des cellules apoptotiques en mesurant le poids moléculaire de différents échantillons dans différents puits.



⇒ **Le puit 1** nous indique qu'ici **sans l'induction** de la caspase-3 au bout de 120 min, l'ADN n'est pas fragmenté, les cellules sont **normales**.

⇒ **Dans les puits 2 à 6**, malgré l'induction de la caspase 3, on a **pas de fragmentation** de l'ADN car le poids moléculaire ne change pas, les cellules sont **normales**.

⇒ **Dans les puits 7 à 11**, après induction de la caspase 3 on observe la **fragmentation** au cours du temps de l'ADN car le poids moléculaire diminue en plusieurs fragments, les cellules sont **apoptotiques**

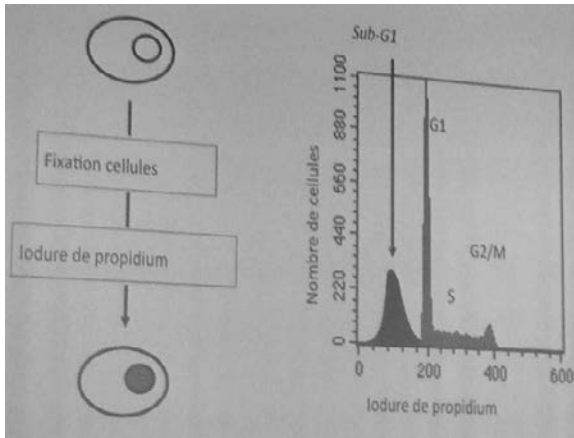
2. TECHNIQUE DU PIC SUB-G1 (CYCLE CELLULAIRE)

Aparté 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 :

Hoescht	Iodure de propidium
Traverse la membrane sans perméabilisation préalable de la cellule.	Nécessite que la cellule soit perméabilisée .
Colore toutes les cellules (nécrotiques/apoptotiques/normales)	Colore principalement les cellules nécrotiques (Leur ADN est accessible)

- 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).

3. TECHNIQUE PAR DOUBLE MARQUAGE

- Technique **par cytométrie de flux**
- On **ne fixe pas** les cellules.
- On introduit les **différents colorants**

1ER MARQUAGE:

- ⇒ On observe par cytométrie de flux, la proportion de cellule colorés à **l'Hoechst** et à **l'iodure de propidium**.
- ⇒ Sachant que les cellules **nécrotiques** seront celles qui fixeront le plus **d'iodure de propidium**, car en l'absence de fixation des cellules, du fait de la libération de leurs contenus (ADN y compris), ce sont les seules où le colorant peut se fixer sur l'ADN.
- ⇒ Cependant, les deux types de cellules pourront fixer la même quantité d'Hoechst.

2EME MARQUAGE:

- ⇒ On utilise la spécificité de l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) lors de l'apoptose grâce à une protéine spécifique de la PS via **l'annexine 5**.
- ⇒ Cependant le marquage reconnaît aussi bien **l'apoptose** (processus qui externalise la PS à la face extérieure de sa membrane à l'aide de la **FLOPPASE**) que la **nécrose** (processus dans lequel, la cellule explose et où la PS est en contact libre avec l'annexine 5.)
- ⇒ Le **double marquage** à l'annexine 5 et à l'iodure de propidium permet de **distinguer** les deux types de cellules (Apoptotique/Nécrotique)

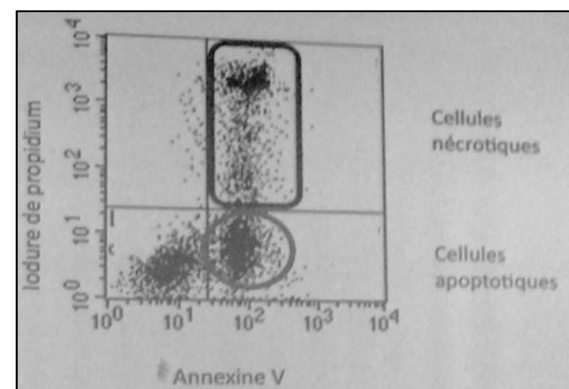
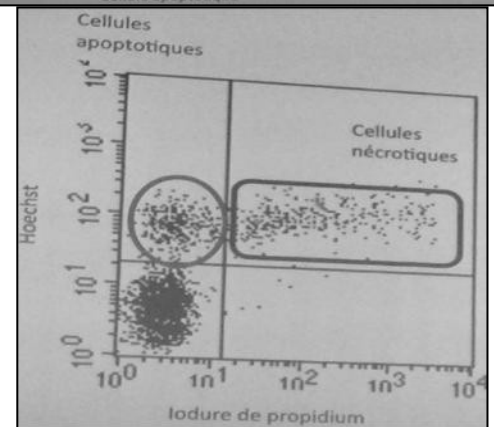
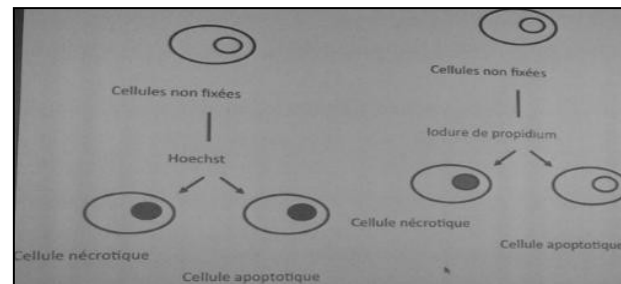


TABLEAU RECAP ++

	HOESCHT	IODURE PROPIDIUM	ANNEXINE-5
NORMAL	+	-	-
NECROTIQUES	+	+	+
APOPTOTIQUES	+	-	+