

## Cours n° 4 : UE bio cellulaire :

### L'apoptose :

#### I. Introduction :

Chez l'homme, environ  $10^8$  cellules (sur  $10^{14}$  cellules au total) engagent un programme de mort cellulaire chaque jour.

Le phénomène d'apoptose est un phénomène connu depuis plus de 150 ans.

##### ➤ Mort cellulaire programmée (MCP) et apoptose :

MCP -> décrit une mort cellulaire qui se produit de manière programmée en lieu et temps au cours du développement.

Apoptose -> définit un tableau morphologique et biochimique stéréotypique d'une forme particulière de mort cellulaire programmée.

##### ➤ Différence apoptose et nécrose :

| APOPTOSE                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | NECROSE                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Caractéristiques morphologiques                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                              |
| - rétrécissement cellulaire, condensation de la chromatine, intégrité de la membrane et des organelles.<br>- formation de corps apoptotiques<br>- signaux de reconnaissance et phagocytose des corps apoptotiques                                                                                        | - gonflement cellulaire et des organelles<br>marginalisation de la chromatine<br>- lyse de la membrane plasmique et fonte des organelles.                                                                                                    |
| Signification physiologique                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                              |
| - affecte des cellules individuellement<br>- stimuli physiologiques. Ex : absence de facteurs de croissance, de cytokines, ischémie, agent pathogène...<br>- stimuli non physiologiques. Ex : radiations, corticoïdes, chimiothérapies...<br>- phagocytose précoce<br>- absence de réponse inflammatoire | - affecte des groupes de cellules<br>- stimuli non physiologiques. ex : stress métaboliques, poisons métaboliques, ischémie...<br><br>- phagocytose tardive<br>- réponse inflammatoire sévère                                                |
| Caractéristiques biochimiques                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                              |
| - processus finement régulé, énergie-dépendant<br>- dégradation internucléosomale de l'ADN<br>- relargage de facteurs mitochondriaux<br>- activation des protéases apoptogènes<br>- altération de la symétrie membranaire et redistribution de la phosphatidylsérine.                                    | - perte des échanges ioniques, énergie-indépendant<br>- dégradation de l'ADN aléatoire<br>- production de ROS par la mitochondrie et relargage de facteurs mitochondriaux<br>- lyse des organelles<br>- destruction de la membrane plasmique |

##### ➤ Autophagie : processus catabolique :

Le stress environnemental ou la carence énergétique entraîne la formation de vésicules autophagiques.

Phagophore -> autophagosome -> lysosome fusionne avec autophagosome -> autophagolysosome

Le contenu des autophagolysosomes est dégradé par les cathepsines.

##### ➤ Les *Caenorabditis elegans* et découverte des gènes de l'apoptose :

Ces nématodes ont un cycle de reproduction qui dure 3 jours, au cours duquel est produit 1090 cellules somatiques. 131 cellules seront éliminées par apoptose au cours du développement (adulte : 959 cellules).

Identification de 11 gènes impliqués dans l'apoptose des cellules de *C. elegans* grâce à la sélection de larves présentant des défauts d'élimination des cellules. On y retrouve un signal, un régulateur négatif (inhibe l'activateur en l'absence de signal), un activateur et un exécuteur.

Or, ces mécanismes contrôlant la MCP sont conservés du nématode à l'Homme.

Chez le mammifère : - BH3 : signal de l'apoptose

- Bcl-2 : régulateur négatif = protège contre l'apoptose
- APAF : activateur
- les caspases : exécuteur

## II. Les caspases : protéases de l'apoptose :

Ce sont des protéases à cystéines capables de cliver des substrats après un acide aspartique (C- ASP-ASES).

On distingue :

- Des caspases avec un rôle d'initiation de l'apoptose. ex : caspase-8, caspase-9...
- Des caspases avec un rôle d'effecteur de l'apoptose. ex : caspase-3, caspase-6...
- Des caspases avec un rôle de maturateur des cytokines. ex : caspase- 1, caspase-11...

### ➤ Mécanismes d'activation :

La pro-caspase est clivée une première fois (au niveau d'un aspartate) permettant la fusion entre la partie P20 et P10.

Il y a un second clivage (toujours au niveau d'un aspartate) qui permet de réduire l'hétérodimère P20-P10.

Puis, deux hétérodimères P20-P10 forme un homodimère d'hétérodimères (2X P20-P10) : caspase activée.

### ➤ Fonction biologique des caspases :

Chez des embryons de souris caspase 9  $-/-$ , on observe des défauts de l'apoptose au niveau du cerveau, alors que chez les souris caspase 8  $-/-$ , on observe des défauts de l'apoptose au niveau du cœur. Dans les deux cas, on assiste à une létalité périnatale.

Aucune caspase n'est capable d'inhiber la totalité des processus apoptotiques au cours du développement embryonnaire (Notion de redondance ou de compensation).

### ➤ Inhibition des caspases par les IAPs :

IAP = Inhibitory of Apoptosis. Toutes ces protéines possèdent au moins un domaine BIR (Baculoviral IAP Repeat).

Les souris XIAP  $-/-$  (XIAP est une des protéines IAPs) n'ont pas de phénotype particulier : il y a donc une redondance et/ou une compensation des différents membres de la famille des IAPs.

### ➤ Protéolyse de substrats par les caspases :

Il y environ 350 substrats lysés par les caspases, ces substrats incluent des protéines impliquées dans :

- Le maintien de l'intégrité cellulaire. Ex : lamines,  $\beta$ -caténines...
- La régulation du métabolisme. Ex : pyruvate kinase...

- La réparation de l'ADN. Ex : Parp
- Le contrôle de la prolifération ou du cycle cellulaire
- Les caspases elles-mêmes

Cette protéolyse entraîne le démantèlement de la structure cellulaire (ex : couple CAD/ICAD qui fragmente l'ADN), la mise en sommeil des voies de survie, et l'exacerbation des voies apoptotiques. Tout ceci entraînant la mort irréversible de la cellule par apoptose.

### III. Les différentes voies d'activation des caspases :

#### a. Voie extrinsèque : les récepteurs de la mort

Ces récepteurs appartiennent à une famille hautement spécialisée.

Différents récepteurs : Fas, CD95, DR4, DR5, TNFR1...

Différents substrats : FasL, Trail, TNF...

##### ➤ Modulation du ligand Trail :

Si le ligand Trail se fixe au niveau de DR4 et DR5, il y a apoptose de la cellule. En revanche, si le ligand Trail se fixe sur des récepteurs « leurres » DcR-1 et DcR-2, il n'y aura pas d'apoptose.

##### ➤ Rôle physiologique du couple Fas/FasL :

Le récepteur Fas est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus (avec une expression renforcée dans le thymus, le foie, les reins, le cœur).

Le FasL est principalement exprimé dans les lymphocytes T activés, les cellules NK et dans les tissus constituant des sites immuns privilégiés.

Le système Fas/FasL joue un rôle prépondérant au cours de la réponse immunitaire :

- déléition des lymphocytes T périphériques matures activés au cours d'une réponse immunitaire
- élimination des cellules infectées par un virus ou cancéreuses (par les lymphocytes T cytotoxiques ou les cellules NK)
- mort cellulaire des cellules inflammatoires au niveau de sites immuns privilégiés (yeux, testicules...)

La potentialité pro-apoptotique de ce système est indispensable au maintien de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, un syndrome lymphoprolifératif nommé ALPS (Autoimmune LymphoProliferative Syndrome) a été identifié : mutation du récepteur Fas ou du ligand FasL.

#### b. Voie intrinsèque : voie mitochondriale :

##### ➤ Les membres de la famille Bcl-2 :

On distingue :

- Les anti-apoptotiques : il possède des domaines BH1, BH2, BH3 et BH4, un domaine d'insertion membranaire pour la mitochondrie, et un site de phosphorylation qui est variable... Ex : Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W...

- Les pro-apoptotiques : soit des « Bax-like » (ex : Bax, Bak...), soit des « BH3-only » (ex : Bad, Bid...)

N.B: BH = Bcl-2 homology domain

➤ Interactions entre les membres de la famille Bcl-2 :

Les membres de la famille Bcl-2 assurent une grande diversité de fonctions biologiques liées aux différences dans :

- leur capacité de former des dimères
- leur localisation cellulaire
- leur profil d'expression cellulaire

➤ Exemple du double KO Bax/Bak :

Souris Bax -/- : souris viable mais stériles (apoptose des cellules germinales)

Souris Bak -/- : souris normales

Souris Bax/Bak -/- : 90% de mortalité périnatale avec une rate et des ganglions hypertrophiques, des pattes palmées.

On note ainsi l'importance du couple Bax/Bak dans la régulation de l'apoptose.

➤ L'apoptosome : lien entre la mitochondrie et l'activation des caspases :

La protéine APAF-1 (Apoptotic Protein Activating Factor) recrute le cytochrome C, et change de conformation rendant ainsi disponible son CARD (Caspase Recruitment Domain).

L'apoptosome est formé par l'oligomérisation des APAF-1, avec des interactions CARD-CARD (phénomène ATP-dépendant).

Puis, il y a recrutement, au niveau des CARDS de l'apoptosome, des pro-caspases-9 qui sont activées en caspases-9. L'activation des caspases-9 entraîne l'activation des caspases-3 ou -7.

Les embryons de souris APAF-1 -/- ou Cyt C -/- montrent des défauts de l'apoptose induite par la mitochondrie avec une létalité périnatale.

**c. Connexions entre la voie des récepteurs de la mort et la voie mitochondriale :**

On a donc vu que :

- La caspase-8 et sa protéine adaptatrice FADD : indispensables à l'apoptose induite par les récepteurs de la mort -> participe à la mise en place du système cardio-vasculaire.
- La caspase-3, la caspase-9, et sa protéine régulatrice APAF-1 : indispensables à l'apoptose mitochondriale -> participe à la mise en place du système nerveux central.

Les deux voies sont connectées par la protéine Bid.

**IV. Physiologie de l'apoptose :**

Les fonctions de l'apoptose est d'élimination les cellules inutiles et/ou dangereuses. Elle est réguée par l'apparition des hormones et est autonome.

Elle joue également un rôle dans le système immunitaire (vu précédemment). Au niveau du thymus, elle permet l'élimination des thymocytes au cours de la sélection thymique (sélection négative et positive). En effet, 95 des thymocytes subiront l'apoptose s'ils n'ont pas de récepteur à l'antigène, si leur récepteur n'est pas fonctionnel, ou s'ils reconnaissent le soi.

## V. Physiopathologie de l'apoptose :

Augmentation de l'apoptose -> maladies neuro-dégénératives (Parkinson, Alzheimer), infarctus, SIDA..

Diminution de l'apoptose -> cancers, syndromes auto-immuns...

### a. **Excès d'apoptose :**

#### ➤ Maladie d'Alzheimer :

Neurotoxicité avec une apoptose précoce et excessive. Il y a des dépôts de plaques  $\beta$ -amyloïdes et une sensibilité accrue aux dérivés réactifs de l'oxygène liée à l'âge.

Il n'y a pas de capacité de régénération des neurones subsistants.

#### ➤ Hépatite fulminante :

Destruction massive des cellules hépatiques par le système immunitaire. Les cellules infectées par le VHB ou le VHC expriment le gène Fas et donc le récepteur Fas. Les Lymphocytes T activés expriment le FasL, et par un contact avec la cellule hépatique infectée, ils vont induire l'apoptose.

### b. **Défaut d'apoptose : les cancers :**

Les cancers correspondent à une dérégulation de la balance prolifération/apoptose, suite à une accumulation d'anomalie...

Dans de nombreuses tumeurs, les suppresseurs de tumeurs (inducteurs de l'apoptose) sont altérés : mutation, expression diminuée, gène silencieux... ex : p53, Fas, caspase-10...

De même, les oncogènes (inhibiteurs de l'apoptose) sont dérégulés : expression augmentée, sur-activation...ex : ras, myc, bcl-2...

## VI. Thérapies :

Le mode d'action de certains agents anti-cancéreux est basé sur la production de réactifs oxygénés par la cellule. Cependant, la sensibilité des cellules cancéreuses au stress oxydatif et à l'apoptose peut altérer l'efficacité du traitement. D'où la nécessité de trouver de nouvelles molécules qui modulent l'activité de protéines impliquées dans la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. D'ailleurs certaines de ces molécules sont actuellement en essais cliniques.

Les membres de la famille Bcl-2 sont des cibles thérapeutiques de choix, car leur dérégulation est présente dans 50% des cancers (surexpression).

Les voies thérapeutiques sont :

- Approche antisens
- Inhibiteurs synthétiques ou naturels
- Ciblage par des peptides de type BH3

## **VII. Techniques de mise en évidence et de quantification de l'apoptose :**

### **a. Modification de la membrane plasmique :**

#### Marquage Annexin-V/Iodure de propidium :

Durant l'apoptose, il y a une externalisation des phosphatidylsérines au niveau de la membrane plasmique par un mécanisme de « FLIP-FLOP ». Le marquage à Annexin-V permet de mettre en évidence les phosphatidylsérines, et donc de mettre en évidence l'apoptose.

Dans les cellules normales, le noyau est imperméable à l'iodure de propidium (PI). Lorsque la cellule est morte, le PI peut rentrer dans le noyau et se fixer à l'ADN. Le PI met donc en évidence les cellules mortes.

#### Trypan Blue :

Il s'agit d'une coloration qui rentre au travers de la membrane des cellules mortes, non viables. On peut ainsi quantifier la proportion de cellules mortes.

### **b. Activation des caspases :**

#### Détection par Western Blot :

On utilise des anticorps anti-caspase (pro-caspase et caspase), et des anticorps anti-caspase active (caspase clivée).

#### Dosage de l'activité :

On utilise un peptide-fluorophore (AFC) qui est un substrat direct des caspases. Lorsque les caspases sont actives elles vont cliver ce peptide, ce qui déclenche de la fluorescence. On mesure la fluorescence grâce au fluoroscan, et on peut ainsi quantifier les cellules en apoptose dans un échantillon.

#### Quantification par FACS (cytométrie de flux) :

On utilise des anticorps anti-caspase qui sont couplés à un fluorochrome. Puis, on étudie les cellules qui sont fluorescentes : l'outil analyse le profil de fluorescence des cellules étudiées pour dire si elles subissent l'apoptose ou pas.

#### Détection in situ :

Toujours grâce à des anticorps anti-caspase couplés à un fluorochrome.

### **c. Substrats des caspases :**

#### Détection par Western Blot :

On utilise des anticorps anti-substrat, et des anticorps anti-substrat clivé.

#### Immunohistochimie ou immunofluorescence :

On utilise des anticorps anti-substrat, et des anticorps anti-substrat clivé.

### **d. Modifications nucléaires :**

#### Fragmentation de l'ADN :

On peut mettre en évidence, grâce à une électrophorèse sur gel, la fragmentation de l'ADN. En effet, lors de l'apoptose, il y a une fragmentation internucléosomale de l'ADN à cause de nucléases spécifiques (ex : CAD). -> On obtient des échelles d'ADN

#### Condensation de la chromatine nucléaire :

On peut marquer les noyaux au DAPI, et donc mettre en évidence la condensation de la chromatine nucléaire chez les cellules apoptotiques. Ceci permet de dire le pourcentage (quantification) de cellules apoptotiques dans un échantillon.

#### Technique TUNEL :

Lors de l'apoptose, l'ADN est fragmenté par des nucléases laissant les extrémités 3'OH libres. On utilise une transférase terminale qui va transférer à ces extrémités libres des dUTP avec un fluochrome. On peut ensuite visualiser directement les cellules qui subissent l'apoptose.

### **e. Modifications mitochondriales :**

#### Démobilisation du cytochrome C : Western Blot après fractionnement sub-cellulaire.

On fait un Western Blot pour la mitochondrie et un Western Blot pour le cytoplasme, puis on compare les résultats. Si le cytochrome C est négatif dans la mitochondrie mais positif le cytoplasme, c'est qu'il y a eu démobilisation du cytochrome.

#### Démobilisation du cytochrome C : Immunohistochimie ou immunofluorescence.

On utilise un anticorps anti-cytochrome C. Puis on regarde si les cytochromes sont cytosoliques (bien répartis, diffus) ou mitochondrial (ponctiformes).

#### Potentiel de membrane mitochondrial :

On fait une analyse par FACS (voir précédemment). Lors de l'apoptose, il y a une chute du potentiel mitochondrial.

**f. Altération du métabolisme :**

MTT et XTT :

Dans les cellules ayant un métabolisme actif : le MTT (soluble jaune) donne du formazan insoluble bleu, tandis que le XTT (soluble jaune) donne du formazan soluble orange. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle à la quantité de cellules viables.

On met les microplaques dans un lecteur mesure qui permet de donner le pourcentage de cellules viables (quantification).

Incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine :

Cette incorporation reflète la synthèse d'ADN qui est un bon index de l'état prolifératif d'une cellule.