

Il existe 2 types de morts cellulaires :

- L'**apoptose**
- La **nécrose**

## I. Apoptose

L'apoptose est une mort **programmée** des cellules, c'est un « **suicide cellulaire** ».

### A- Caractéristiques de l'apoptose

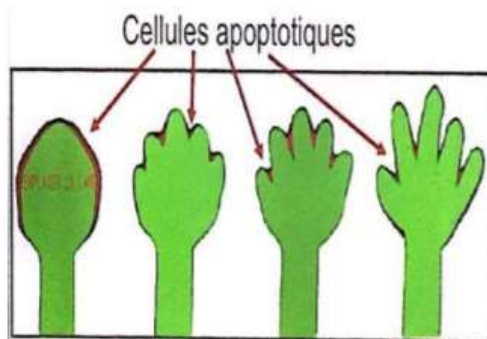
1. Elle peut être **physiologique** ou **pathologique**.
2. Elle est déclenchée de manière **contrôlée** par des signaux **intra ou extra-cellulaire**.
3. Elle est contrôlée par la mise en place de **cascades réactionnelles** et l'activation de **gènes spécifiques**.
4. C'est un processus **ATP-dépendant**.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

### B- L'apoptose en physiologie

#### a) Rôle de l'apoptose dans l'embryogénèse

Au cours du **développement embryonnaire**, l'**apoptose** est mise en jeu lors :

- Du **remodelage des doigts**, les mains sont d'abord des palettes, les doigts sont ensuite séparés grâce à l'apoptose des cellules initialement entre 2 doigts.



- Du **remodelage du nombre de neurone** dans le cerveau, 50% des neurones seront détruits au cours de la vie.

#### b) Rôle dans l'homéostasie tissulaire

L'apoptose contribue à l'équilibre cellulaire :

- ➔ Trop d'apoptoses provoque des maladies dégénératives.
- ➔ Un déficit entraîne des processus de cancérisation et de maladies infectieuses.



Par exemple : la réaction immunitaire

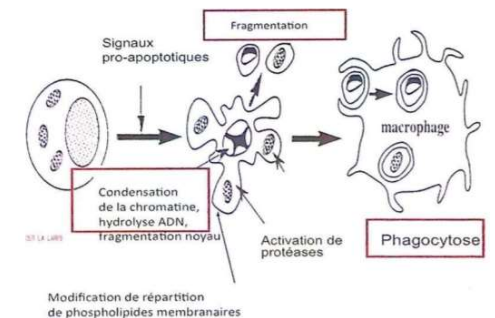
- Lors d'une infection, il y aura une **amplification** du clone des **lymphocytes** nécessaires à la production d'anticorps (=augmentation du nombre de cellules).
- Lorsque l'infection est guérie, les **lymphocytes** vont entrer en **apoptose** (pour rétablir le nombre normal de cellules).

#### c) Rôle dans l'élimination des cellules malades

Les cellules qui ont un défaut de fonctionnement sont **éliminées**. L'apoptose est un processus **onco-supresseur** très puissant. Donc un **dérèglement de l'apoptose, peut aboutir à un cancer**.

### C- Caractéristiques d'une cellule apoptotique

- **Condensation** générale de la **cellule** (sans libération de contenu)
- **Condensation** anormale de la **chromatine** (qui prend une forme de croissant)
- **Fragmentation/hydrolyse** de l'**ADN** entre les nucléosomes
- **Noyau semi-lunaire**
- **Fragmentation** complète de la **cellule** qui forme des **corps apoptotiques**
- **Extériorisation de phosphatidyl-sérine** grâce à la **floppase** (normalement intra-cellulaire). Cette phosphatidyl-sérine sera reconnue par les **macrophages** pour être **phagocyter**, **SANS** réaction inflammatoire.
- La **membrane** des corps apoptotiques **est intacte**
- Ça prend environ 1 journée



## D- Mécanismes d'induction de l'apoptose

## a) Généralités

Au final, la cellule sera détruite par **protéolyse** permise par des **caspases** de 2 types :

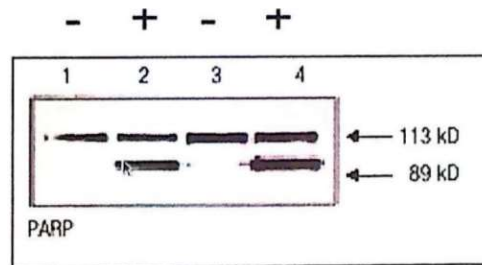
Caspase initiatrices	Caspases effectrices
Caspases <b>8, 9 et 10</b>	Caspases <b>3, 6 et 7</b>
Ces protéases vont cliver les pro-caspases effectrices, les transformant en caspases effectrices <b>actives</b>	Ces protéases vont effectuer des <b>clivages protéiques spécifiques</b> à l'intérieur de la cellule <b>apoptotique</b> (PARP, actine, lamine...)

## Exemple : l'activité des caspases effectrices sur PARP

En gel de polyacrilamide sds, on observe le **clivage** des protéines-clés de la cellule par les **caspases effectrices** (comme notamment PARP).

→ Pistes 1 et 3 : pas d'induction des caspases effectrices, PARP est intacte, non clivé.

→ Pistes 2 et 4 : Suite à l'induction des caspases effectrices, on observe 2 bandes, donc on déduit qu'il y a eu clivage de la protéine PARP, liée à l'apoptose.



L'apoptose peut être déclenchée par 2 types de voie :

- Voie **intra-cellulaire**
- Voie **extra-cellulaire**

## b) La voie intracellulaire : mitochondrie dépendante

→ Cette voie répond à des **signaux intra-cellulaires** de stress.

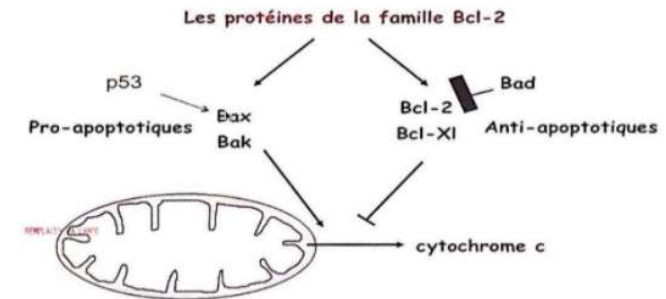
→ Cette voie est dite mitochondrie dépendante car les mitochondries sont les réservoirs d'une **hémoprotéine**, le **cytochrome C** qui permet d'aboutir à la cascade d'activation des caspases !

→ Ce mécanisme passe par l'activation des protéines de la famille des **BCL2** (B-Cell Leucemia). Certaines protéines de cette famille ont une action **pro-apoptotique**, d'autres une action **anti-apoptotique**.

## Protéines de la famille BCL-2

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

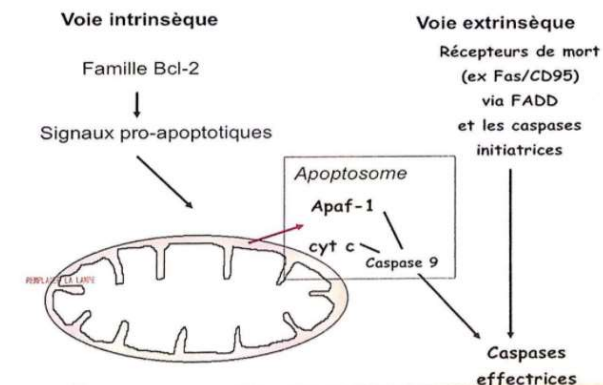
Ces protéines ont pour cible les **mitochondries**, afin que celles-ci libèrent leurs **cytochromes C** dans le cytosol pour pouvoir former l'**apoptosome** (complexe pro-apoptotique composé de **cytochrome C** + **APAF1**). Celui-ci permettra l'activation de la caspase initiatrice 9 qui activera une caspase effectrice entraînant la fragmentation de la chromatine, de la lamine, du cytosquelette...



## c) La voie extracellulaire : mitochondrie indépendante

Elle répond à des **signaux extérieurs** à la cellule par des **récepteurs de mort** appartenant à la super famille des récepteurs TNF (Fas/CD95). Via des **protéines intra-cytosoliques** (FADD). Ces protéines vont cliver les caspases initiatrices, qui cliveront les effectrices etc...

Récap :

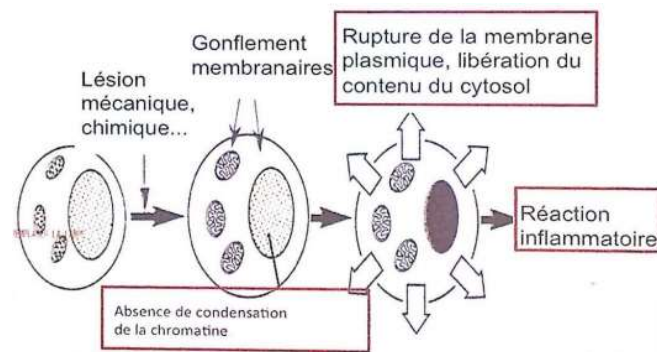


II. NécroseA- Caractéristique de la nécrose

1. Elle peut être **physiologique** ou **pathologique**.
2. Elle est déclenchée de manière **non spécifique** par des actions **physiques** ou **chimiques**.
3. La cellule nécrotique **gonfle** puis **explose avec** une rupture de membrane.
4. C'est un processus **ATP-indépendant**.
5. **Présence de réponse inflammatoire**, à cause du contenu des cellules qui ont explosé.
6. Cette inflammation **amplifie** le phénomène de nécrose à l'ensemble des tissus alentours (nécrose entraîne nécrose)

B- Caractéristique d'une cellule nécrotique

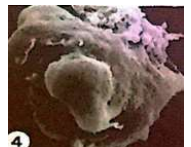
- **Absence de condensation** générale de la **cellule**.
- **Absence de condensation** de l'**ADN**
- La cellule **grossit** et **explose**, avec une **libération** de son contenu.
- **Libération** de la **phosphatidyl-sérine** hors de la cellule qui suite à son explosion libère son contenu.

C- Distinctions entre cellule apoptotique et nécrotique

Ces 2 cellules sont des cellules **nécrotiques**.  
Fragmentation de la membrane plasmique



Ces 2 cellules sont des cellules **apoptotiques**.  
Croissant chromatinien + corps apoptotiques

a) La technique de la caspase 3

Technique par **électrophorèse** sur gel d'agarose qui se base sur le fait qu'en **apoptose** on assiste à une **fragmentation** de l'ADN (l'ADN sera coupé entre les nucléosomes) et de la chromatine en général.

On va induire ou non l'apoptose grâce à cette caspase 3 et on observera au cours du temps la fragmentation de l'ADN pour **différencier** les cellules normales des cellules apoptotiques en mesurant les poids moléculaires des différents échantillons dans les différents puits.

→ Dans le **puits 1** : On n'a pas d'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** : On induit la caspase 3 et malgré ça, on n'observe pas de **fragmentation** de l'ADN, les cellules sont **normales**.

→ Dans les **puits 7 à 11** : On induit la caspase 3 et on **observe une fragmentation** de l'ADN au cours du temps (plusieurs fragments), les cellules sont **apoptotiques**.

Caspase-3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Minutes	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	
Puits	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11



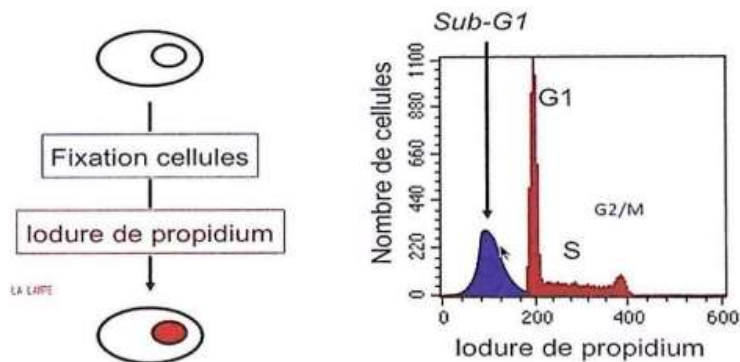
## b) La technique du pic Sub-G1 (cycle cellulaire)

Cette technique utilise la **cytométrie de flux**. Mais avec quels colorant ?!?

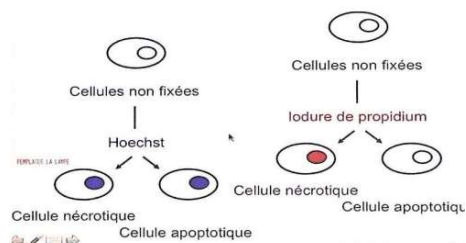
HOESCHST	IODURE DE PROPIDIUM
Traverse la membrane <b>sans</b> nécessairement une perméabilisation préalable	Nécessite une perméabilisation de la cellule pour pouvoir rentrer
Colore <b>toutes</b> les cellules	Colore les cellules <b>nécrotiques</b> (qui ont déjà leurs membranes perméables)

On fixe préalablement les cellules donc elles sont **perméabilisées** et on va utiliser de l'**iodure de propidium**.

→ Si la cellule est apoptotique, on observera un **pic sub-G1**. Ces cellules sont fragmentées, elles ont donc encore moins d'ADN que les cellules en G1, qui elles possèdent pourtant un ADN non dupliqué, donc une quantité minimale pour une cellule vivante.



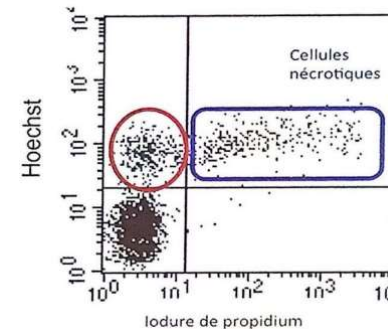
## c) La technique par double marquage



On utilise là aussi la **cytométrie de flux**, mais cette fois on ne les **fixe pas**. Finalement on introduit **différents colorants (2)**.

1<sup>er</sup> marquage → Hoechst + IP :

On observera la proportion de cellules colorées à l'hoechst et à l'iodure de propidium. On sait que les cellules **nécrotyques** fixeront l'**iodure de propidium**, alors que les cellules **apoptotiques** ne le fixeront pas. Cependant, toutes les cellules pourront fixer l'hoechst.



Les cellules entourées en rouge ont fixé de l'hoechst, mais pas l'iodure de propidium. Ce ne sont donc pas des cellules nécrotyques. Entourées en bleu, on a les cellules fixant l'iodure de propidium et l'hoechst, ce sont donc des cellules nécrotyques. Cependant, le colorant ne se fixe pas toujours, ce qui explique les points en bas à gauche.

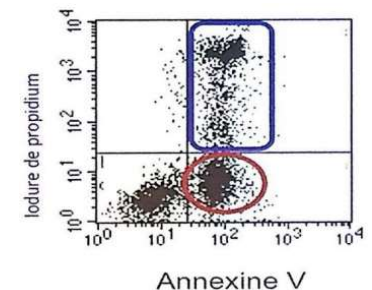
2<sup>ème</sup> marquage → annexine 5 + IP :

L'apoptose externalise la phosphatidyl-sérine, mais lors de la nécrose, la PS est aussi externalisée.

On utilise ici de l'**annexine 5** qui reconnaît spécifiquement la PS. Donc cette annexine pourra colorer les cellules **nécrotyques** et **apoptotiques** mais pas les cellules normales.

Ici les cellules encadrées de bleu seront donc marquées par les deux colorants, donc **nécrotyques**, alors que celles entourées en rouge ne fixeront que l'annexine 5, elles seront donc **apoptotiques**.

Finalement les cellules normales se retrouveront dans le carré en bas à gauche.



## Récap colorants :

	HOESCHT	IODURE DE PROPIDIUM	ANNEXINE-5
NORMALES	+	-	-
NECROTiques	+	+	+
APOPTOTIQUES	+	-	+