

MORT CELLULAIRE

Il existe deux types de mort pour une cellule : l'**apoptose** ou la **nécrose**.

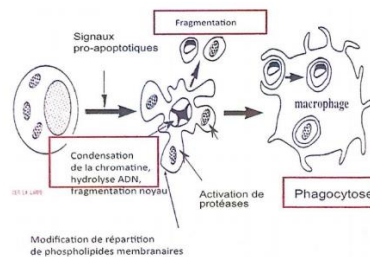
I. Apoptose

L'**apoptose est une mort programmée (suicide) cellulaire.**

A. Caractéristique de l'apoptose

Caractéristique de l'apoptose

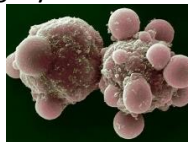
- ⇒ Signaux extra (absence de facteur de croissance, infection virale, radiation) ou intracellulaires (anomalie de l'ADN) déclenchent de façon contrôlée l'apoptose
- ⇒ Cascades réactionnelles particulières et activation de gènes spécifiques contrôlent le déroulement. L'apoptose est un phénomène programmé.
- ⇒ Processus ATP-dépendant
- ⇒ Cellules apoptotiques reconnues par macrophages ou autres cellules phagocytaires puis éliminées par phagocytose
- ⇒ Pas de réaction inflammatoire



B. Cellule apoptotique

Caractéristiques d'une cellule apoptotique

1. Condensation générale de la cellule sans libération de son contenu
2. Condensation anormale de la chromatine en périphérie du noyau, forme de croissant
3. Fragmentation de l'ADN
4. Fragmentation complète de la cellule avec formation de corps apoptotiques
5. Extériorisation de la phosphatidyl-sérine, qui se trouve normalement en intra-cellulaire (sur le feuillet interne de la bicouche lipidique) grâce au flip flop. La PS passe sur le feuillet externe et va être reconnue par les macrophages qui pourront alors phagocyter la cellule sans réaction inflammatoire.



C. Apoptose dans les processus physiologiques

L'apoptose est reliée à de nombreux processus **physiologiques** ou normaux de notre corps notamment au développement normal de l'embryon, dans l'homéostasie cellulaire ou encore dans l'élimination des cellules malades.

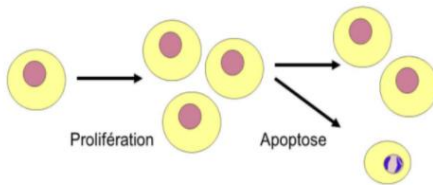
- ⇒ Développement normal de l'embryon (embryogénèse) = On retrouve le phénomène de l'apoptose dans le remodelage des doigts ou dans la sélection neuronale (où 50% des neurones sont détruits). Une inhibition de l'apoptose peut être source de malformation en cas de dysfonctionnement.



- ⇒ Homéostasie cellulaire : Normalement, on doit retrouver un équilibre cellulaire entre prolifération et apoptose.

Exemple : en cas d'infection, les cellules lymphocytaires se multiplieront ce qui entraîne une augmentation du nombre totale de cellules. Lorsque l'infection cesse, on se retrouve avec un nombre plus important de cellules par rapport à la normale. Il est donc important de supprimer les cellules immunitaires en trop afin de retrouver un équilibre.

L'inhibition de l'apoptose dans ce cas peut être source de maladie auto-immune.



- ⇒ Elimination des cellules malades = les cellules qui possèdent défaut de fonctionnement vont être éliminées par apoptose. On peut constater la mise en place de cancérisation en cas d'inhibition de l'apoptose.

★ **Des dérèglements de l'apoptose ont donc des conséquences majeures en physiologie.** ★

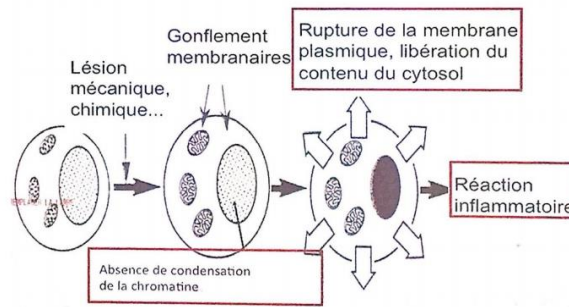
→ Un excès de l'apoptose peut conduire à des maladies neurodégénératives.

II. Nécrose

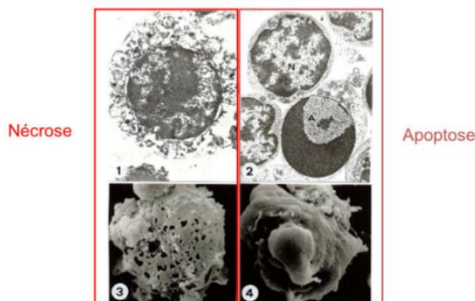
La nécrose est une mort cellulaire accidentelle.

A. Caractéristiques de la nécrose

Caractéristique de la nécrose
⇒ Mort cellulaire causées essentiellement par atteintes physiques/chimiques (brûlure, ischémie)
⇒ A la suite d'une agression sévère
⇒ Processus ATP-indépendant
⇒ Gonflement puis explosion de la cellule nécrotique caractérisée par une rupture de sa membrane
⇒ Présence d'une réaction inflammatoire car libération du contenu des cellules nécrotiques lors de l'explosion
⇒ Nécrose touche ensemble des cellules du tissu soumis à l'agression



B. Distinction entre cellules apoptotiques et nécrotiques



Les images 1 et 2 ont été visualisées par microscopie à transmission, les images 3 et 4 par microscopie à balayage. On reconnaît en 1 et en 3 des cellules nécrotiques avec la fragmentation de la membrane plasmique (trouée). On reconnaît les cellules apoptotiques sur les images 2 et 4 grâce à la condensation de la chromatine sous forme de croissant.

1. Comment reconnaître une cellule apoptotique via la fragmentation de l'ADN ?

Electrophorèse d'ADN	⇒ L'ADN d'une cellule apoptotique est fragmentée.	
	⇒ Par électrophorèse sur gel d'agarose, on va pouvoir séparer les molécules d'ADN en fonction de leur taille.	
	⇒ Donc si une cellule est apoptotique, on apercevra une fragmentation de l'ADN.	
		On aperçoit ici, dans la deuxième partie de cette électrophorèse, une fragmentation de l'ADN.

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

<p>Technique SubG1</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Par cytométrie de flux (= les cellules rendues fluorescentes circulent dans un appareil qui se chargera de les analyser individuellement et de déterminer leurs états en fonction de la quantité de fluorescence.) ⇒ Les cellules ont été préalablement fixées et le colorant que l'on utilise est l'iodure de propidium. ⇒ Normalement, on observe deux pics : 1 en G1 et 1 en G2 ⇒ Si la cellule est apoptotique, on observera un pic subG1 	
<p>Technique par double marquage</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Par cytométrie ⇒ Cellules ne sont pas fixées ⇒ Différents colorants : double marquage (iodure de propidium et Hoechst) <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div data-bbox="392 609 694 891" style="flex: 1;"> </div> <div data-bbox="715 638 1497 851" style="flex: 2;"> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Les cellules nécrotiques fixent l'IP ainsi que l'Hoechst (rectangle bleu) puisque l'IP peut passer par les trous de la membrane plasmique et l'Hoechst colore toutes les cellules. ⇒ Les cellules apoptotiques fixent l'Hoechst (cercle rouge) et pas l'IP puisque ce colorant nécessite une perméabilisation. </div> </div>	

Hoechst : traverse la membrane sans perméabilisation préalable de la cellule et colore toutes les cellules (apoptotiques, nécrotiques, normales).

iodure de propidium : Nécessite que la cellule soit perméabilisée et donc colore principalement les cellules nécrotiques (leur membrane plasmique trouée laisse passer l'IP).

2. Comment reconnaître une cellule apoptotique via des modifications membranaires ?

On observe une modification de la membrane importante chez les cellules apoptotiques :

- ⇒ Extériorisation de la PS par flip flop sur feuillet externe
- ⇒ Permet à la cellule d'être reconnue et phagocytée par le macrophage

Iodure de propidium et annexine 5	
Lorsque la cellule nécrosée explose, la PS se retrouve obligatoirement externalisée. L'annexine 5 reconnaît la PS et marquera les cellules apoptotiques et nécrotiques.	
	<p>Donc d'après ce que nous avons dit précédemment :</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Les cellules nécrotiques fixent l'IP ainsi que l'annexine 5 (rectangle bleu) ⇒ Les cellules apoptotiques fixent seulement l'annexine 5 (cercle rouge) <p>Permet de faire la distinction entre les deux types cellulaires !</p>

3. Comment reconnaître une cellule apoptotique via la protéolyse ?

Protéolyse = dégradation des protéines via des protéines spécifiques

Elle permet, par son activation, de déclencher l'apoptose. Les caspases, inactivées normalement, ainsi que les mitochondries ont un rôle important à jouer dans l'apoptose.

- ✓ Les caspases

On retrouve deux types de caspases :

Caspases initiatrices (8, 10) :

Activées par les récepteurs de mort et par auto-activation, elles cliveront les pro-caspases effectrices pour les rendre actives.

Caspases effectrices (3,6,7) :

effectuent des clivages protéiques spécifiques à l'intérieur de la cellule apoptotique. (PARP, I-CAD, actine, lamine...)

Les caspases effectrices vont cliver des protéines clés (exemple : PARP qui reconnaît les dommages) et vont permettre de déclencher l'apoptose.

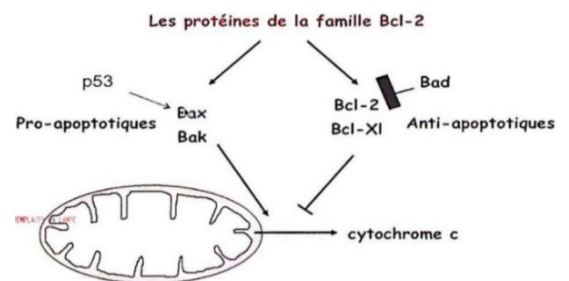
- ✓ Mitochondries

Les mitochondries sont une usine à énergie de la cellule et contiennent également du cytochrome C qui peut permettre de déclencher l'apoptose.

On retrouve deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

Voie intrinsèque = voie de la mitochondrie dépendante

- ✓ Signaux intracellulaires de stress
- ✓ Intervention de protéines de la famille BCL2 (pro-apoptotique = BAX, BAK et BAD, anti-apoptotique = BCL2 et BCL-X) qui vont cibler les mitochondries
- ✓ Les pro-apoptotiques permettent de faire libérer les cytochromes C dans le cytosol afin de constituer l'apoptosome (complexe pro-apoptotique composé de cytochrome C et d'APAF1).
- ✓ Activation de la caspase 9 par l'apoptosome
- ✓ Les anti-apoptotiques empêchent la libération du cytochrome C



La libération de ce cytochrome c est donc sous le contrôle des membres de la famille BCL2.

Voie extracellulaire = voie de la mitochondrie indépendante

- ✓ Signaux extérieurs par des récepteurs de mort appartenant à la famille des récepteurs au TNF (Fas/CD95) via des protéines intra-cytosoliques (FADD)
- ✓ Apoptose défaillant dans le cas de cancer (en cas d'augmentation de BCL2, d'une inhibition de l'apoptose ou encore une inhibition de p53)

FIN

SENESCENCE ET VIELLISSEMENT

I. Viellissement

La sénescence est un processus qui peut intervenir suite à un raccourcissement des télomères et en réponse à un stress cellulaire.

Définition du vieillissement :

D'un point de vue de l'organisme = c'est la dégradation progressive de la fonctionnalité des organes, liée d'un point de vue cellulaire au raccourcissement inexorable des télomères.

Le **vieillissement** est permis par de nombreux dysfonctionnement comme la protéostasie, les altérations épigénétiques, l'érosion des télomères, l'instabilité génomique, une mauvaise communication intercellulaire, un épuisement des cellules souches, un dysfonctionnement mitochondrial, une dérégulation des systèmes de mesure des nutriments et l'accumulation de cellules sénescentes.

Une accumulation de cellules sénescentes à un rythme normal représente un vieillissement normal **mais si le rythme d'accumulation de ces cellules s'accélère, cela peut engendrer la formation de maladies liées au vieillissement.**

L'accumulation de cellules sénescentes engendre le **vieillissement**.

II. Cancer

On retrouve deux grands types de gènes contribuant à la formation d'un cancer :

- ⇒ Les oncogènes
- ⇒ Les gènes suppresseurs de tumeurs.

En condition physiologique, les deux sont en équilibre (autant d'oncogènes que de suppresseurs de tumeurs). Dans le cas du cancer, on assiste à **un déséquilibre entre les deux**. Cela va entraîner la mise en place du processus d'oncogénèse.

	Oncogènes	Suppresseurs de tumeur
Mutation	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Dominante - mutation suffisante sur 1 allèle ⇒ Gain de fonction 	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Récessif - 2 allèles doivent être mutés ⇒ Perte de fonction ⇒ L'allèle peut déjà avoir été muté à la naissance. La probabilité de mutation et donc d'inactivation du deuxième allèle est plus élevée (exemple des enfants hétérozygotes pour Rb).
Exemple	⇒ Ras	⇒ P53/p16/p21/Rb

Quand les oncogènes sont activés, ils favorisent l'activation du cancer.

La sénescence est un mécanisme onco-suppresseur.

Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

Les gènes suppresseurs de tumeur interviennent dans différentes voies et permettent l'activation et le contrôle de la sénescence. Ils sont donc d'une importance majeure dans ce processus.

La sénescence est un mécanisme onco-suppresseur

Exemple : Les grains de beauté sont constitués de **cellules sénescentes** (mélanocytes sénescents) ayant subi une **mutation oncogénique** qui est lié dans 50% des cas à une mutation de BRAF.

Parfois, un phénomène survient (comme une exposition aux UVs) et empêche le mélanocyte d'entrer en sénescence, alors le grain de beauté peut dégénérer en **mélanome**.



A gauche un naevi, à droite un mélanome

SENESCENCE CELLULAIRE

I. Introduction

A. Généralités

La sénescence est un mécanisme de réponse au stress. La cellule peut recevoir deux types de signaux :

- Un signal de stress → peut permettre la sénescence ou l'apoptose
- Une absence de signal mitogénique → peut permettre un arrêt transitoire (quiescence) ou apoptose

Plusieurs devenirs s'offrent à la cellule dans lesquels elles ne se divisent plus :

Quiescence	Sénescence	Apoptose
<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt transitoire du cycle cellulaire - Métaboliquement active 	<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt permanent du cycle cellulaire - Métaboliquement active 	<ul style="list-style-type: none"> - Mort programmée sous l'effet d'un stress important - Métaboliquement inactive

B. Marqueurs

Le rôle du marqueur est de différencier l'état des cellules.

Quel marqueur pour cellule en état mitotique ?

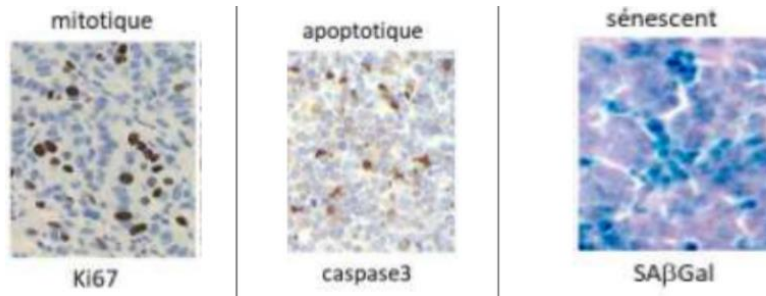
- **Ki67**, marqueur **absolu**.
- **Marquage positif rend les cellules foncées** et **démontre** que ces cellules sont en train de se diviser. Utilisé dans les cancers pour déterminer leur état prolifératif.

Quel marqueur pour cellule en état apoptotique ?

- **Caspase 3**, marqueur **absolu**.
- **Marquage positif rend les cellules foncées** et **démontre** que les cellules sont en apoptose.

Quel marqueur pour cellule en état sénescence ?

- **SABGal**, marqueur **relatif** (pas spécifique de la sénescence).
 - **Marquage positif rend les cellules bleues** à cause d'une **augmentation de l'activité lysosomiale**. Quelque soit la nature de cette augmentation (processus physiologique ou cellule entrant en sénescence), la cellule apparaîtra bleutée dans ces conditions et ce marqueur ne peut donc que **suggérer** que les cellules sont sénescences.
- ⇒ Plusieurs marqueurs doivent donc être utilisés pour démontrer qu'une cellule est sénescence.



C. Histoire de la sénescence

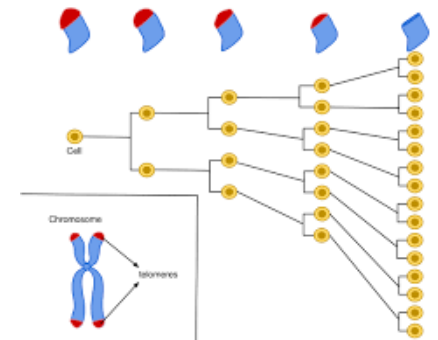
- ✓ Avant 1960 => les scientifiques pensaient que les cellules étaient **immortelles**, n'étaient pas soumises au vieillissement et qu'elles pouvaient **se diviser indéfiniment**.
- ✓ En 1960 => Léonard Hayflick réalise une expérience à partir de fibroblastes et a réussi à démontrer qu'il existait un **temps répliatif** au bout duquel les cellules arrêtaient de se diviser. Elles gardent en mémoire le nombre de divisions qu'elles ont fait indépendamment du temps (âge répliatif ou potentiel répliatif). Hayflick permet, à travers cette expérience, de faire naître la notion de **sénescence cellulaire**.

II. Causes de la sénescence

A. Sénescence répliative

A chaque division les **extrémités chromosomiques**, aussi appelés les **télomères**, s'érodent au fur et à mesure des divisions. Chaque répliation de l'ADN s'ensuit d'une délétion de quelques nucléotides. C'est la conséquence d'un **processus moléculaire physiologique**.

A partir d'un certain nombre de division, les cellules entrent en sénescence selon le processus suivant :



Raccourcissement des télomères devient de plus en plus important
 ↓
 Des gènes importants sont touchés
 ↓
 Déclenchement de la voie de signalisation des dommages à l'ADN
 ↓
 Activation de p53
 ↓
 Apoptose ou sénescence

- ⇒ La **téломérase** (absente dans les cellules somatiques) est une enzyme particulière qui permet de **remplacer l'ADN manquant des extrémités chromosomiques**. On la retrouve notamment durant la gamétogénèse et l'embryogénèse. Elle est également activée chez les cellules cancéreuses, ce qui rend la cellule immortelle (rappel du cours du Méthode d'étude de la cellule).

B. Stress oncogénique

La sénescence peut être également liée à un stress oncogénique (mutation d'un oncogène).

Stress oncogénique = sénescence induite par les oncogènes = OIS

A l'état physiologique, on retrouve des proto-oncogènes. Dans certains cas, ces gènes peuvent muter et devenir oncogénique.

Exemple : la mutation de RAS est suivie d'un **arrêt de la prolifération (ce qui est surprenant connaissant la nature de RAS)**. C'est en réalité un processus de sénescence prématuré en réponse au stress oncogénique. Cela est permis grâce à l'activation de la protéine p53 qui déclenche la sénescence.

La sénescence permet une protection face au cancer en arrêtant la prolifération.
→ Dommages à l'ADN = activation de p53 qui déclenche la sénescence.

C. Sénescence prématurée

Quand ?

- Stress oxydatif, suralimentation, irradiations, activités oncogéniques, carences, mauvais contact intercellulaire.

→ **Stress insurmontable (souvent lié à un stress réplicatif) pour la cellule qui va entrer en sénescence ou en apoptose.**

III. Caractéristiques de la sénescence

Les cellules en sénescence sont repérables par une combinaison de caractéristiques, pas forcément toutes spécifiques de la sénescence d'où l'utilité de combiner plusieurs marquages intra/extracellulaires avant de déterminer l'état de sénescence.

Intracellulaire

⇒ **Arrêt de croissance**

Arrêt de prolifération visible par cytométrie de flux

⇒ **Modification de la morphologie**

Cellules aplaties, large, aspect d'œuf au plat, contour réfringent

⇒ **Noyau**

Apparition de foyers **hétérochromatines** (SAHF) à la coloration DAPI

⇒ **Augmentation de l'activité B-Galactosidase**

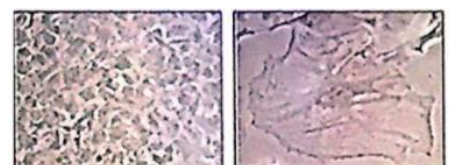
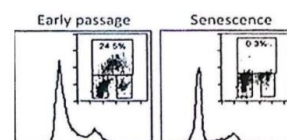
Caractéristique de la cellule en sénescence

⇒ **Apoptose**

Les cellules sénescents deviennent résistantes à l'apoptose

⇒ **Test laboratoire**

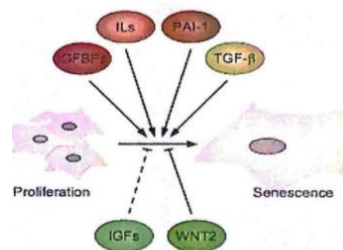
Activation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR), augmentation des marqueurs utilisés dans les voies de réponses des dommages à l'ADN (Kinase ATM phosphorylés, variants histone H2AX phosphorylés, activation de p53 par phosphorylation)



Extracellulaire :⇒ **Sécrétion de facteurs spécifiques (SASP)**

Sécrétion de **molécules de remodelage de la MEC** (métalloprotéase) et **pro-inflammatoires** (interleukine, prostaglandine), **facteur de croissance** (héréguline) par les cellules sénescents permettant de les maintenir dans cet état sénescents. Ce contexte pro-inflammatoire permet d'attirer les cellules immunitaires. L'inflammation est stérile, locale et ambivalente et pourra être :

- de courte durée/transitoire = elle **sera bénéfique** car les cellules aux alentours vont libérer des facteurs spécifiques permettant de recruter des **cellules immunitaires** (ex : macrophages) et favoriser la cicatrisation
- de longue durée = **dommages** au niveau des tissus, responsable du **vieillessement**



Les cellules sénescents seront éliminés par un mécanisme **pro-inflammatoire**. Quand le système immunitaire a du mal à éliminé toutes les cellules sénescents, on observera une accumulation de cellules sénescents et cela causera un phénomène de vieillissement et/ou un processus physiologique.

L'introduction de p53 dans une tumeur permet **une activation de la transcription de gènes** codant pour les cellules immunitaires qui vont **phagocyter** les cellules sénescents. P53 permet donc de faire régresser la tumeur.

Immuno-surveillance = système immunitaire va considérer les cellules sénescents comme des cellules stressées et va les éliminer (initialement)
Immuno-sénescence = système immunitaire de moins en moins compétent avec le temps et va progressivement présenter un déficit qui va conduire l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus. Formation d'un environnement pro-inflammatoire, entraînant le **vieillessement** du tissu.

Petit récap des familles

Principales caractéristiques de la sénescence des fibroblastes

Les cellules présentent un **nombre limité de doublement de population** (entre 30 à 70 doublements)
Il existe **deux voies effectrices de l'arrêt G1/S** (activation de P53 et surexpression de P21 et augmentation de P16 et de Rb non phosphorylé)
Les cellules se souviennent **du nombre de division indépendamment du temps chronologique** (sablier mitotique).
La cellule sénescente n'est pas morte, elle est **métaboliquement active**.

Acquisition/modification fonctionnelles dans les cellules sénescentes

Elles présentent une **morphologie altérée** (étalement des cellules, augmentation du volume cellulaire, de la taille des noyaux, augmentation biogénèse des lysosomes...) ainsi **qu'une résistance à l'apoptose** (fibroblaste et lymphocytes T mais pas les cellules endothéliales).
On constate une expression de « marqueurs » comme une **B-galactosidase, une dégradation de la matrice extracellulaire** via l'augmentation de métalloprotéases (collagénase, stromélysine) et une sécrétion de **cytokines inflammatoires et facteurs de croissance** (héréguline).

FIN

*Voilà, j'en ai fini pour la sénescence ! J'ai essayé de bien condenser les informations de la ronéo même si je la trouvais déjà concise et super bien faite (bravo à Titouf)... J'espère qu'elle vous conviendra, n'hésitez pas à relire de temps en temps les ronéos au cas où puisque je n'ai pas remis tous les extraits des diapos du prof mais sinon la fiche est relativement complète !
Si vous avez des retours à faire, hésitez pas à venir m'en parler si FB ou sur le fofo*

Donnez tout, rien n'est jamais perdu !!