

MORT CELLULAIRE

Il existe 2 grands types de mort cellulaire très différents :

Apoptose = mort cellulaire programmée = « suicide cellulaire » ++

Nécrose = mort cellulaire accidentelle ++

I. APOPTOSE

A. CARACTÉRISTIQUES DE L'APOPTOSE

1) Déclenchée de manière **contrôlée** par des signaux **extra-cellulaire** (en raison d'une absence de facteurs de croissance, infections virales, radiations...) ou **intra-cellulaire** (due à des anomalies de l'ADN : par exemple p53 qui reconnaît les dommages de l'ADN). De cette façon, la cellule apparaît comme « **altruiste** » car elle préfère se **suicider** plutôt que de créer un organe dysfonctionnel.

2) Le déroulement de l'apoptose strictement est contrôlé par la mise en jeux de **cascades réactionnelles** particulières en plus de l'activation de **gènes spécifiques**.

→ **PROGRAMMÉ** (non au hasard) ++

3) Processus **ATP-dépendant** +++

Il faut fournir à la cellule de **l'énergie** pour mourir.

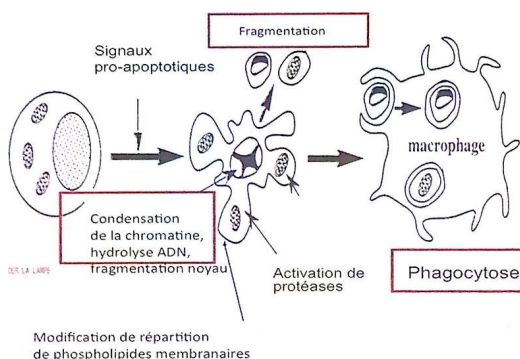
4) Les **macrophages** et les autres cellules phagocytaires peuvent **reconnaître** les cellules apoptotiques et les éliminer par phagocytose.

5) **Absence** de réponse **inflammatoire** +++
(À la différence de la nécrose, cf. plus loin :))



B. CARACTÉRISTIQUES D'UNE CELLULE APOPTOTIQUE

Volume cellulaire	Diminution du volume par condensation générale de la cellule (aucun contenu libéré)
État de la chromatine	Condensation anormale en forme de croissant
État de l'ADN	ADN fragmenté
État de la cellule	Fragmentation complète en formant des corps apoptotiques (qui seront phagocytés)
État de la membrane cellulaire et organites	Membrane intacte, intègre ++ donc non trouée (d'où le fait aucun contenu soit libéré) avec extériorisation de la phosphatidyl-sérine (voir plus loin) et organites intacts
Impact	Atteint généralement une cellule de manière isolée
Contexte	La plupart du temps, l'apoptose survient au cours d'un phénomène physiologique



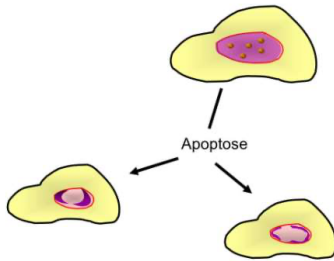
GAUCHE : cellule normale

MILIEU : cellule apoptotique (avec la fragmentation et la condensation)

DROITE : macrophage qui reconnaît la cellule apoptotique et qui vient la phagocyter

N.B. : L'apoptose prend environ une journée.

Condensation de la chromatine: une étape caractéristique de l'apoptose



HAUT : cellule normale avec coloration DAPI normale

BAS : cellule apoptotique avec la condensation de la chromatine en forme de croissant en périphérie du noyau

→ Forme caractéristique de la coloration DAPI

++ La **condensation de la chromatine** est donc une étape caractéristique de l'apoptose ++

C. L'APOPTOSE EN PHYSIOLOGIE

→ Pleins de processus cellulaires **normaux** et **physiologiques** dépendent de l'apoptose, c'est une partie intégrante +++

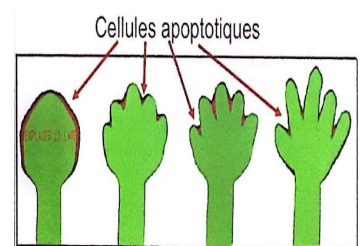
1) INDISPENSABLE AU DÉVELOPPEMENT NORMAL DE L'EMBRYON

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



Modelage des doigts par apoptose des cellules entre les tissus (cf. embryo) :

Ces processus peuvent être source de **malformation** s'il y a un dysfonctionnement (comme les doigts de pieds non décollés, je le décris car je ne veux pas une photo de pied sur ma fiche ^^)



Sélection neuronale :

Nos neurones sont détruits dans la période périnatale, ce qui est indispensable pour le développement normal du SN. Environ **50%** sont détruits.

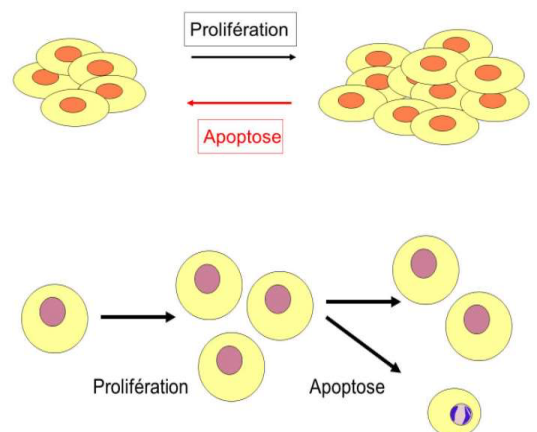
2) INDISPENSABLE À L'HOMÉOSTASIE TISSULAIRE

L'apoptose contribue à l'équilibre cellulaire car elle permet de garder une **balance** entre **prolifération** et **apoptose** +++

Réaction immunitaire :

Lors d'une **infection**, les clones de **lymphocytes** qui sont capables de produire un certain type d'**anticorps** vont voir une **augmentation** du nombre de cellules lymphocytaires pour produire davantage l'anticorps spécifique.

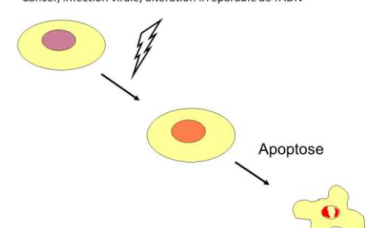
Une fois l'infection **guérie**, ce nombre conséquent n'est plus nécessaire. Les lymphocytes entrent en **apoptose** (diminution) pour rétablir le nombre **normal** de cellules.



3) IMPLIQUÉE DANS L'ÉLIMINATION DES CELLULES MALADES

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

Cancer, infection virale, altération irréparable de l'ADN



PROBLÈME : On s'aperçoit que l'apoptose est un phénomène ayant des conséquences **majeures en pathologie** en cas de dérèglement.

L'inhibition est corrélée à :

- Des **malformations** (exemple des pieds)
- Des maladies **auto-immune** (à cause d'un excès de lymphocytes)
- À la **cancérisation** (absence d'un équilibre)

À l'inverse des excès d'apoptose peuvent conduire à

- Maladie **neurodégénératives** (Alzheimer...)
- **Séquelles** de l'infarctus
- ...

II. NÉCROSE

A. CARACTÉRISTIQUES DE LA NÉCROSE

- Mort cellulaire causée essentiellement par atteintes **physiques** ou **chimiques** (ischémie, brûlures, traumatismes...)
- Résultat des **agressions sévères** subies par la cellule
- Processus **ATP-Indépendant** +++
- Présence de réaction **inflammatoire** (⚠ à l'inverse de l'apoptose où pas de rupture de membrane ++ à cause de la **libération** du contenu des cellules dû à leur explosion)

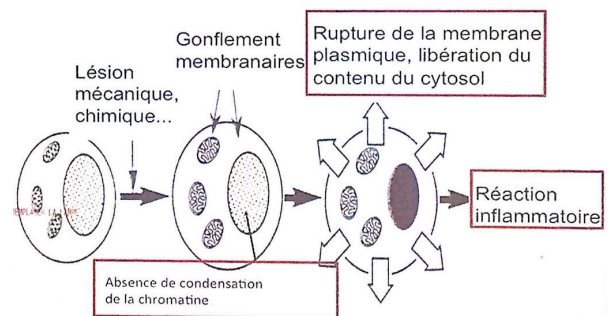
B. CARACTÉRISTIQUES D'UNE CELLULE NÉCROTIQUE

Volume cellulaire	Augmentation du volume car la cellule nécrotique gonfle puis explose
État de la chromatine	Pas de condensation mais une dispersion
État de l'ADN	
État de la cellule	Explosion de la cellule avec libération de son contenu
État de la membrane cellulaire et organites	Membrane rompue lors de l'explosion (d'où la libération du contenu de la cellule en dehors) et organites impactés
Impact	Ensemble des cellules d'un tissu soumis à une agression
Contexte	Pathologique

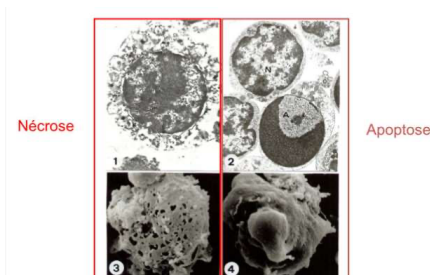
GAUCHE : cellule normale

MILIEU : cellule nécrotique avec un gonflement membranaire et pas de condensation

DROITE : explosion de la cellule avec réaction inflammatoire et libération d'organites



III. DISTINCTION ENTRE CELLULE APOPTOTIQUE ET NÉCROTIQUE



HAUT : microscopie à **transmission** (plus de détails)

BAS : microscopie à **balayage** (3D)

PHOTO 1 ET 3 : Nécrose (fragmentation de la membrane plasmique visible)

PHOTO 2 ET 4 : Apoptose (forme de croissant très dense aux électrons ce qui est lié chromatine condensée)

IMAGE À CONNAITRE +++ (N pour normale, A pour apoptotique)

A. COMMENT RECONNAÎTRE UNE CELLULE APOPTOTIQUE VIA LA FRAGMENTATION DE L'ADN ?

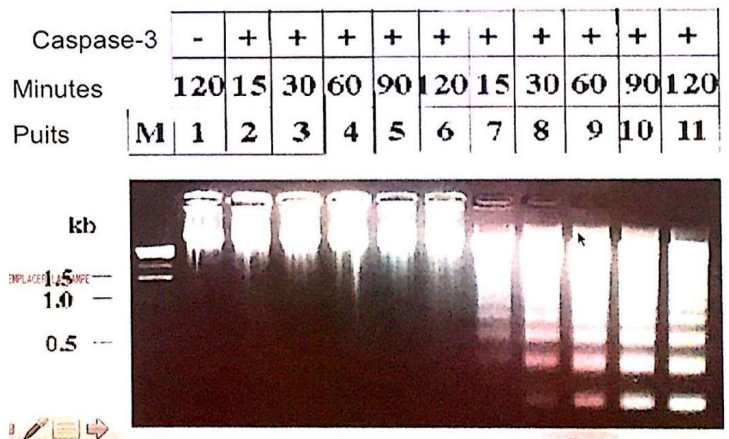
1^{RE} TECHNIQUE : ÉLECTROPHORÈSE D'ADN DE CELLULES EN APOPTOSE

Principe : Induire l'apoptose et observer au cours du temps la **fragmentation** de l'ADN en mesurant le **poids moléculaire**

Outils : **Électrophorèse sur gel d'agarose** (effet d'un maillage, cf. génétique)

Puit 1 : **sans** induction (-) de la **caspase-3** au bout de 120min, l'ADN n'est pas fragmenté donc les cellules sont **normales**

Autres puits : après **induction** de la **caspase 3**, on observe la fragmentation de l'ADN au cours du temps car le poids moléculaire **diminue** en plusieurs **petits fragments** (+ grande progression car + petite taille)



2^{ME} TECHNIQUE : TECHNIQUE DU PIC SUB-G1 (CYCLE CELLULAIRE)

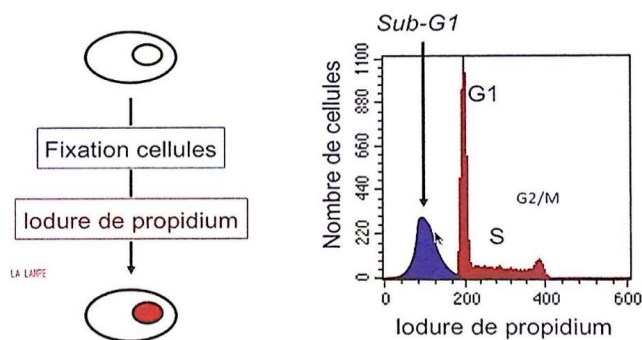
⚡ RAPPEL :

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.

Principe : Marquer les cellules par **cytométrie**

Outils : Utilisation d'un colorant d'ADN = **iodure de propidium ++**

Condition préalable : **Fixer** les cellules ce qui permet de les **perméabilisées** + (la membrane de la cellule est perméable permettant au colorant de rentrer)



Généralement avec cette technique, on retrouve **2** pics : un **pic G1** et un **pic G2** (les deux les plus à droite).

→ La fragmentation de la cellule lors de l'apoptose entraîne la **perte** de certaines parties du noyau et donc du matériel génétique (car création de corps apoptotiques), ce qui a une influence sur la **quantité d'ADN** donc de fluorescence émise par la cellule (+ petits corps, - d'ADN, - de fixation d'iodure, - de fluorescence).

→ Du fait de l'apoptose, on observe un **autre** pic, le **pic sub-G1** (à gauche), caractéristique de la **fragmentation** apoptotique.

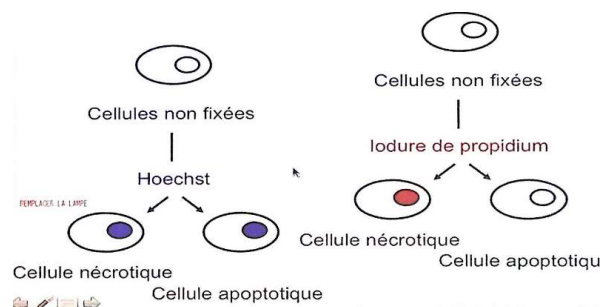
3^{ME} TECHNIQUE : TECHNIQUE PAR DOUBLE MARQUAGE

Principe : Distinguer les cellules nécrotiques de apoptotiques

Condition préalable : On **NE fixe PAS** les cellules ++

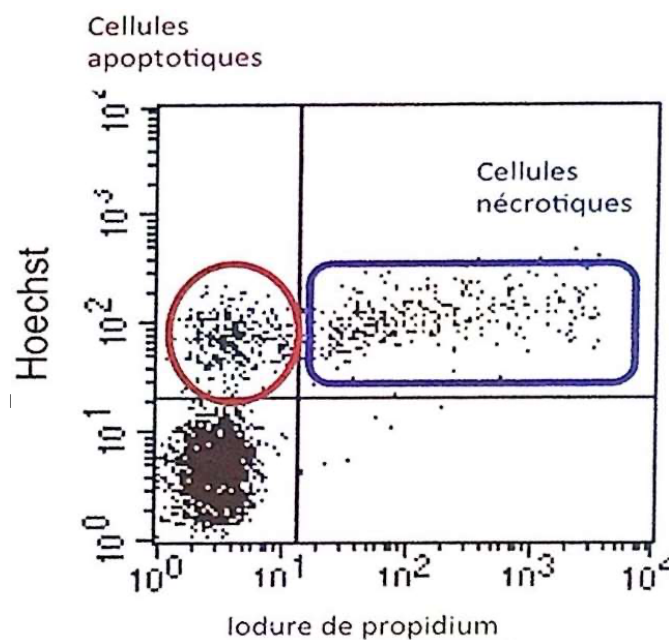
Outils : Utilisation de différents colorants

→ Double marquage = **2** colorants : **Hoechst + Iodure de propidium +**



Caractéristiques des colorants utilisés	
Hoechst	Iodure de propidium
1) Se repère au niveau des ordonnées 2) Traverse la membrane sans perméabilisation préalable de la cellule (c'est-à-dire que même si la membrane de la cellule est intacte, il est capable de la traverser)	1) Se repère au niveau des abscisses (⚠ après avec l'annexine, il sera au niveau des ordonnées) 2) Traverse la membrane de la cellule que si elle est perméabilisée (il faut des trous dans la membrane, pour que le colorant puisse passer)

Résultats du marquage Hoechst + IP ++



⚠ RAPPEL :

Membrane des cellules nécrotiques : lésée, avec des trous (avec perméabilisation)

Membrane des cellules apoptotiques : intacte, sans trous (sans perméabilisation)

→ On observe par cytométrie de flux, la **proportion** de cellules colorées à l'Hoescht et à l'iodure de propidium. Chaque petit point représente une quantité de fluorescence :

- Plus on **monte**, plus on a de cellules colorées par l'**Hoescht**
 ⚠ En-dessous de la barre horizontale, on considère que les cellules ne sont pas colorées par Hoescht.
- Plus on va vers la **droite**, plus on a de cellules colorées à l'**IP**
 ⚠ À gauche de la barre verticale, on considère que les cellules ne sont pas colorées par IP.

🔬 Hoescht :

Ce colorant traverse la membrane sans nécessité de perméabilisation.

Il est donc capable de **traverser** la membrane des cellules **nécrotiques** (cette membrane est perméable), celle des cellules **apoptotiques** et des cellules **normales** (dont les membranes sont imperméables).

→ Coloration de **toutes** (toutes celles qui ont de l'ADN, pas les GR) les cellules (N, N et A) avec une **fixation égale** de la quantité d'Hoescht

🔬 Iodure de propidium :

Ce colorant nécessite une perméabilisation.

La membrane des cellules **nécrotiques** explose, elle est donc **perméable** (contrairement aux cellules normales ou apoptotiques).

→ L'IP ne peut fixer / colorer **QUE** les cellules nécrotiques.

Au-dessus de la barre horizontale : **fixation** de l'Hoescht

À gauche de la barre verticale : **non** fixation de l'IP (donc pas de perméabilisation)

→ Le **cercle** représente les cellules **apoptotiques**.

Au-dessus de la barre horizontale : **fixation** de l'Hoescht

À droite de la barre verticale : **fixation** de l'IP (donc perméabilisation)

→ Le **rectangle** représente les cellules **nécrotiques**.

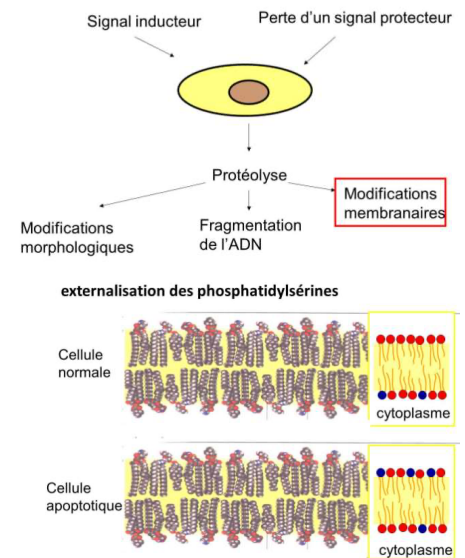
NB : Marge d'erreur (osef) :

On observe un amas de cellules non coloré par les deux colorants (car à gauche et en dessous des barres) : la fixation ne marche pas tout le temps très bien. On retrouve des points sous la barre horizontale et à gauche de celle verticale, ça veut dire qu'ils ont fixé IP mais pas Hoescht (pas logique vu les explications), là aussi c'est la marge d'erreur.

B. COMMENT RECONNAÎTRE UNE CELLULE APOPTOTIQUE VIA LES MODIFICATIONS MEMBRANAIRES ?

Une cellule apoptotique connaît des modifications **membranaires** non négligeables :

- 1) Dans une cellule **normale**, on retrouve la **phosphatidyl-sérine** (PS) sur le feuillet **interne** de la bicouche lipidique (cf. compartiment) : il existe une **asymétrie** de sa répartition.
- 2) Dans les cellules **apoptotiques**, un processus **actif** de **flip flop** expose les PS (petite boule bleue) sur le feuillet **externe** de la membrane : modification de la symétrie de la PS qui est **extériorisée** +++
- 3) La PS sera **reconnue** par les cellules phagocytaires (notamment les macrophages) pour être **phagocytées** : PS permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues
→ Propriété utilisée en cytométrie



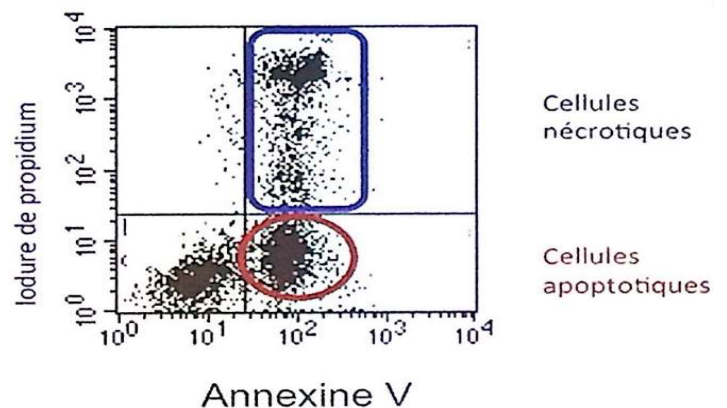
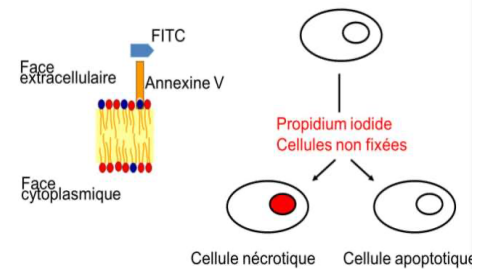
TECHNIQUE : DOUBLE MARQUAGE IP + ANNEXINE 5

Il existe une protéine spécifique qui reconnaît PS : l'**annexine 5** ++
FITC est un fluorochrome.

Objectif du double marquage : **distinguer** les cellules nécrotiques et apoptotiques (IP en ordonnée, annexine 5 en abscisse)

L'annexine 5, qui a besoin d'une **perméabilisation**, marque les cellules **apoptotiques** et **nécrotiques** mais **pas** les cellules **normales** ++ car :

- Cellules nécrotiques (perméabilisation) : fixe **IP** et **annexine 5**
→ Au-dessus et à droite des barres : **rectangle**
- Cellules apoptotiques (sans perméabilisation mais extériorisation de PS) : fixe **annexine 5** mais **pas IP**
→ En-dessous et à droite des barres : **cercle**
- Cellules normales (sans perméabilisation et sans extériorisation de PS) : fixe **ni l'annexine 5, ni l'IP**
→ En-dessous et à gauche : cellules normales + marges d'erreur



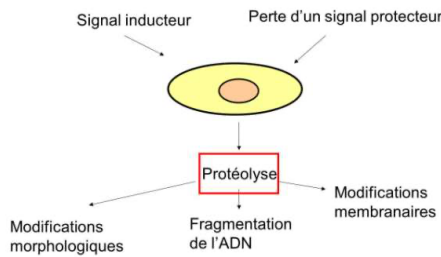
RÉCAP ++++	HOESCHT	IP	ANNEXINE
NORMAL	+	-	-
NÉCROTQUES	+	+	+
APOPTOTIQUES	+	-	+

ANALOGIE :

Cellules nécrotiques laisse tout passer car quand on est mort soudainement on ne peut s'opposer à rien.

Cellules apoptotiques laisse passer la majorité mais pas tout car quand on est en train de mourir, on peut encore faire des choix.

C. COMMENT RECONNAÎTRE UNE CELLULE APOPTOTIQUE VIA LA PROTÉOLYSE ?



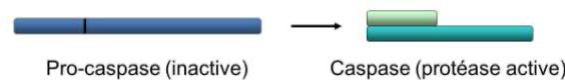
Ce qui va vraiment **déclencher** cette mort cellulaire par apoptose c'est l'activation de la protéolyse.

Protéolyse : dégradation des protéines via des protéines spécifiques

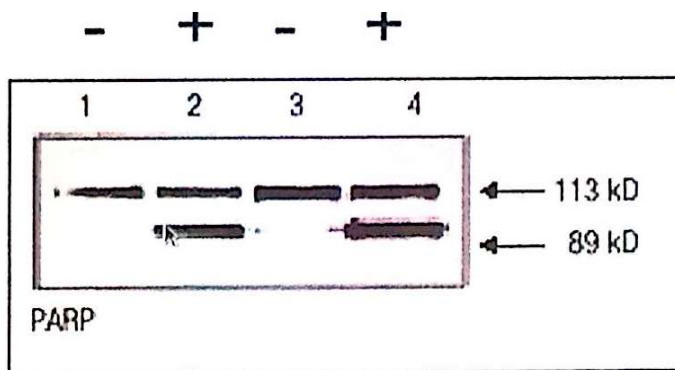
1) LE RÔLE DES CASPASES

Résultat final de l'**apoptose** : **destruction** de la cellule par **protéolyse**

Ce mécanisme se met en place à l'aide de caspases. À l'état normal, elles ne sont pas actives. Il en existe 2 types :



Caspases INITIATRICES	Caspases EFFECTRICES
Caspases 8, 9, 10	Caspases 3, 6, 7
Elles sont activées par récepteur de mort ou par auto-activation . Ce sont les protéases initiateurs 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)



Activation des caspases et protéolyse des protéines clés (exemple sur **PARP**, reconnaissance des dommages).

En gel de polyacrilamide sds, on observe :

→ Piste 1 et 3 : **sans** induction des caspases effectrices, la protéine PARP est **intacte**, pas de clivage

→ Piste 2 et 4 : **avec** induction des caspases effectrices, on observe **2 bandes**, donc il y a eu **clivage** de la protéine PARP = apoptose

2) LE RÔLE DES MITOCHONDRIES

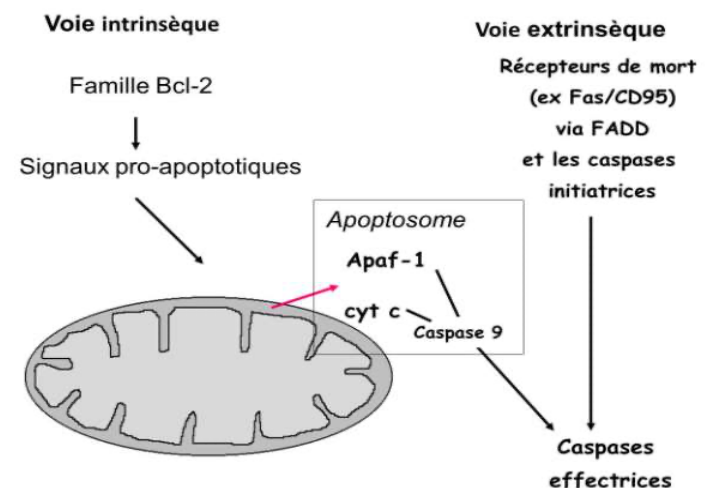
🔦 RAPPEL BIOCH :

Les mitochondries sont les usines biochimiques de la cellule. Elles produisent la majeure partie de l'ATP.

Elles constituent un **réservoir** d'une **hémoprotéine**, le **cytochrome C**, une molécule essentielle dans la majorité des processus **apoptotiques**.

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

- Voie **intrinsèque**
- Voie **extrinsèque**



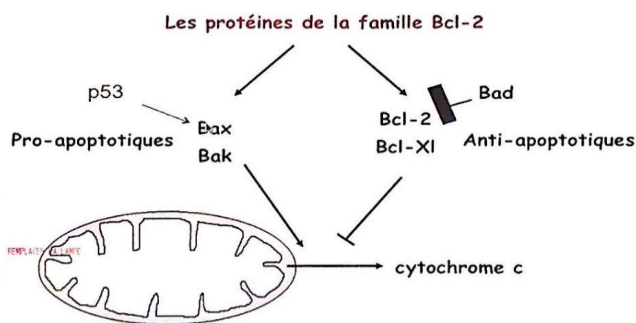
📍 VOIE INTRINSÈQUE : MITOCHONDRIE DÉPENDANTE

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

→ Elle est dite « **mitochondrie dépendante** » car le cytochrome C se trouvant dans les mitochondries permet d'aboutir à la **cascade d'activation** des caspases.

→ Ce mécanisme passe par l'activation des protéines de la **famille BCL2** pour « B-cell leukemia ». Certaines protéines de cette famille ont une action **pro**-apoptotique, d'autres une **anti**-apoptotique.

Protéines de la famille BCL2	
PRO-apoptotique	ANTI-apoptotique
BAX ++ (Cible de p53 , induit la sortie du cytochrome C)	BCL2 ++ (Bloque la sortie du cytochrome C)
BAK	BCL-X
BAD (Inhibe BCL2)	



- 1) Les protéines de la famille **BCL2** ont pour cible les **mitochondries**
- 2) Elles rendent leur membrane plus **perméable**
- 3) **Libération** par les mitochondries du **cytochrome C** dans le cytosol
- 4) Formation de l'**apoptosome** = complexe composé de cytochrome C + APAF1
- 5) L'apoptosome active caspase **9** **initiatrice**
- 6) Elle-même active une caspase **effectrice**
- 7) Fragmentation de la chromatine, la lamine, le cytosquelette...

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

📍 VOIE EXTRINSÈQUE : MITOCHONDRIE INDÉPENDANTE

1) Réponse à des signaux **extérieurs** à la cellule par des **récepteurs de mort** appartenant à la famille des récepteurs au **TNF (Fas/ CD95 +)**

2) Activation des protéines **intra**-cytosoliques comme **FADD** (pas d'intervention de la mitochondrie donc « mitochondrie indépendante »)

3) Clivage des protéines **initiatrices** par ces protéines

4) Clivage des protéines **effectrices** (par protéines initiatrices)

5) Fragmentation de la chromatine, la lamine, le cytosquelette...

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

- **Surexpression** des protéines **anti**-apoptotiques, par exemple BCL (donc - d'apoptose)
- **Inhibition** de l'**apoptosome** (donc - d'apoptose aussi)
- **Inhibition** de **p53** (la seule dédi : on aime p53 ❤️)

