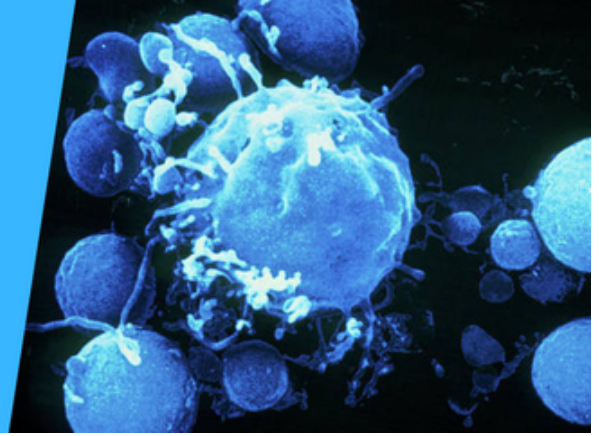


Mort cellulaire



Il existe **2 grands types** de **mort cellulaire** très différents :

- **Apoptose** = mort cellulaire **programmée** = « **suicide cellulaire** » ++
- **Nécrose** = mort cellulaire **accidentelle** ++ = brûlure

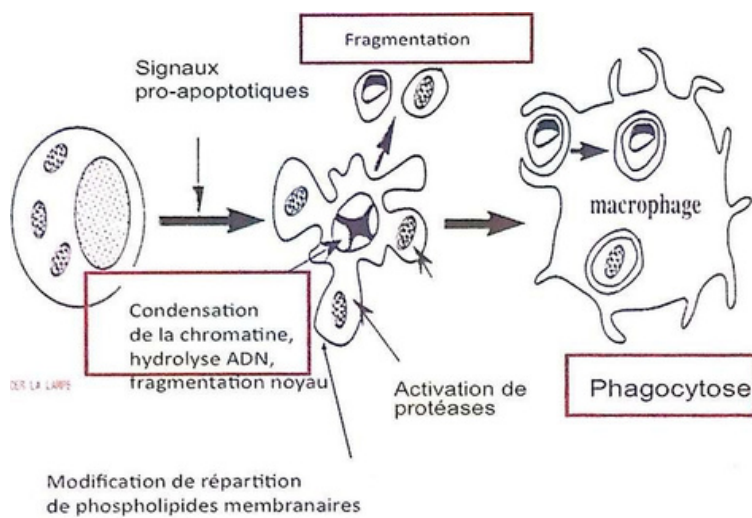
I - Apoptose

a) Les 5 Caractéristiques de l'apoptose

1) Signalisation	Déclenchée de manière contrôlée par des signaux extracellulaire (en raison d'une absence de facteurs de croissance, infections virales, radiations...) ou intra-cellulaire (due à des anomalies de l'ADN, ex: 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) Programmé	Le déroulement de l'apoptose strictement est contrôlé par la mise en jeu de cascades réactionnelles particulières en plus de l'activation de gènes spécifiques. → PROGRAMMÉ (non au hasard) +++
3) ATP-dépendant 🚩	C'est un processus ATP-dépendant +++ = Il faut fournir à la cellule de l'énergie = ATP pour mourir.
4) Phagocytose	Les macrophages et les autres cellules phagocytaires peuvent reconnaître les cellules apoptotiques et les éliminer par phagocytose .
5) Ø Inflammation	Absence de réponse inflammatoire +++ (Contrairement à la nécrose)

b) Les 7 Caractéristiques d'une cellule apoptotique 🚩🚩🚩

Volume cellulaire	<u>Diminution du volume</u> 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 ensuite 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	<u>La plupart du temps, l'apoptose survient au cours d'un phénomène physiologique</u>



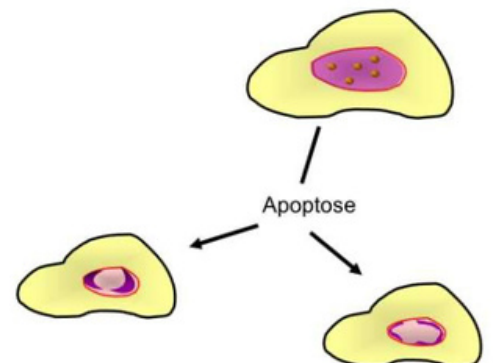
Gauche : cellule normale

Milieu : cellule apoptotique (fragmentation + condensation)

Droite : macrophage qui reconnaît la cellule apoptotique et qui vient la phagocytiser

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 **apoptique** 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**

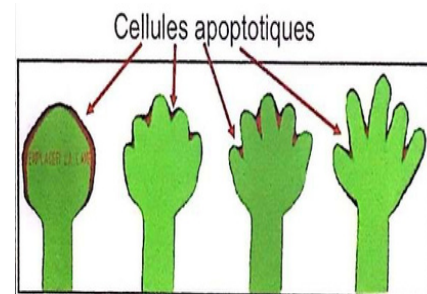
→ Pleins de processus cellulaires **normaux** et **physiologiques** dépendent de l'apoptose, c'est une **partie intégrante de la physiologie d'un organisme ++** 🇫🇷🇫🇷🇫🇷

L'apoptose est :

1) Indispensable au développement normal de l'embryon 🇫🇷

Lors du **développement embryonnaire = l'embryogénèse + 🇫🇷 +** , 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 = syndactylie)
- **Sélection neuronale** : Nos neurones sont détruits dans la période périnatale, ce qui est indispensable pour le développement normal du système nerveux. Environ **50% sont détruits**.

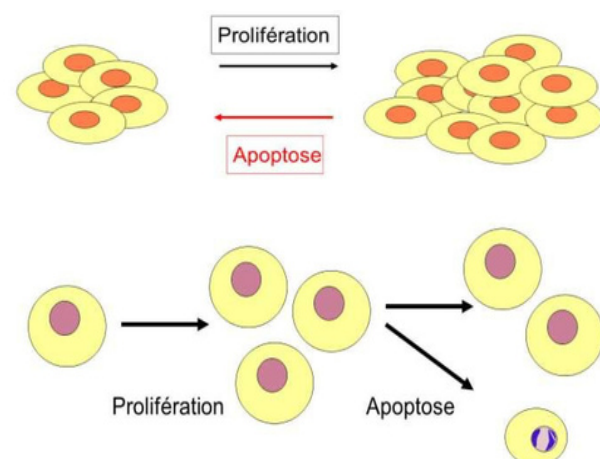


2) L'apoptose est indispensable à l'homéostasie tissulaire

L'apoptose contribue à l'**équilibre cellulaire** car elle permet de garder une **balance entre prolifération et apoptose +++**. Prenons l'exemple de la **réaction immunitaire** :

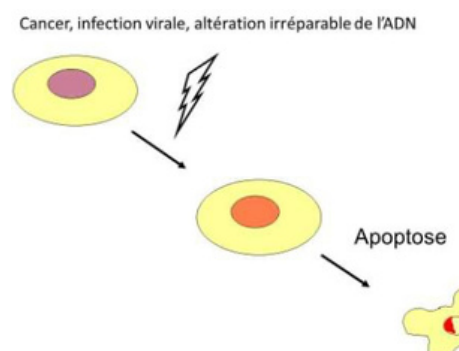
Lors d'une **infection**, les clones de lymphocytes qui sont capables de produire un certain type d'anticorps vont voir une augmentation du nombre de cellules lymphocytaires pour produire davantage l'**anticorps spécifique**.

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**. L'organisme est capable de les reconnaître et de les **éliminer**.



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

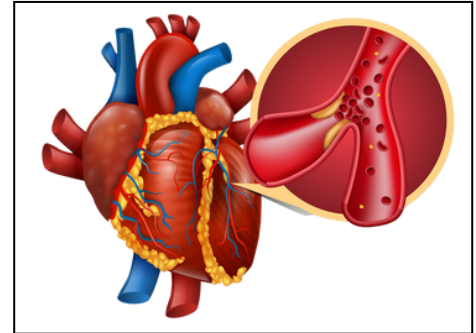
Ainsi, l'**inhibition** de l'apoptose est corrélée à :

- Des **Malformations** (ex: pieds/main subissant une syndactylie)
- Des **maladies auto-immunes**
- A la **cancérisation**




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

- Des Maladies **neurodégénératives** (ex: Alzheimer)
- D'**infarctus** du Myocarde
- D'infections **virales**
- De pathologies **hépatiques**



II - La Nécrose

a) Les 3 Caractéristiques de la Nécrose

1) Agressions Physique ou Chimique	Mort cellulaire causée essentiellement par des atteintes physiques ou chimiques (ischémie, brûlure, traumatisme). Elle est le résultat des agressions sévères subies par la cellule.
2) ATP indépendant 	C'est un processus ATP-indépendant +++ contrairement à l'apoptose .
3) Inflammation	Présence d'une réaction inflammatoire +++ , à cause de la libération du contenu des cellules (par rupture membranaire absente dans l'apoptose) dû à leur explosion

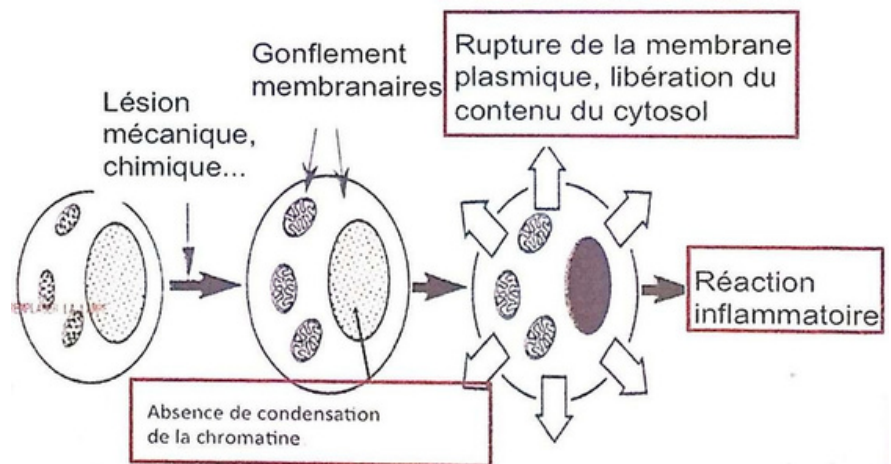
b) Les 7 Caractéristiques d'une cellule nécrotique 🚩🚩🚩

Volume cellulaire	Augmentation du volume car la cellule nécrotique gonfle puis explose
État de la chromatine	Pas de condensation mais une dispersion de la chromatine ++ 🚩
État de l'ADN	ADN fragmenté mais de façon irrégulière/non ordonnée -> dégradation de l'ADN
État de la cellule	Explosion de la cellule avec libération de son contenu (d'où l'inflammation)
État de la membrane cellulaire et organites	Membrane rompue lors de l'explosion (d'où la libération du contenu cellulaire et des organites) et organites impactés (perte de leur fonctionnalité)
Impact	Ensemble des cellules d'un tissu soumis à une agression
Contexte	Pathologique, Agressions externes sévères

Gauche : cellule **normale**

Milieu : cellule **nécrotique** avec un **gonflement membranaire** et pas de condensation

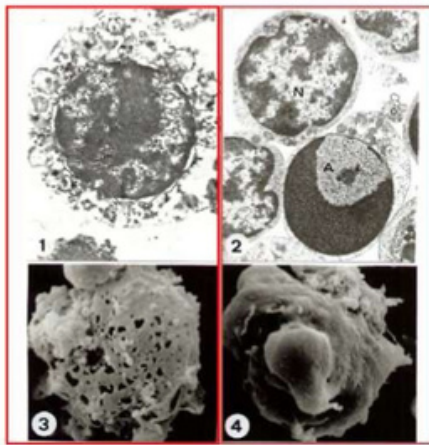
Droite : **explosion** de la cellule avec **réaction inflammatoire** et libération d'organites



III - Distinction entre cellules apoptiques et nécrotiques

Nous avons à notre disposition toute une batterie de moyens et de tests pour reconnaître une cellule **apoptotique** ou **nécrotique**

a) Reconnaître une cellule **apoptique/nécrotique** par ses **modifications morphologiques = observation microscopique +++** (cf. Cours Méthodes d'études de la cellule) **🚩🚩🚩**



En haut : Au microscopie à **transmission** = **MET** (plus de détails)

En bas : Au microscopie à **balayage** = **MEB** (3D)

- **N comme Nécrose** (fragmentation de la membrane plasmique visible)
- **A comme Apoptose** (forme de croisant très dense aux électrons ce qui est lié chromatine condensée)

À apprendre par ❤️

b) Reconnaître une cellule **apoptique** via la **fragmentation de l'ADN + 🚩🚩🚩**

1ère technique : Électrophorèse d'ADN de cellules en apoptose = Échelle du nucléosome

- **Principe** : Induire l'apoptose et observer au cours du temps la fragmentation de l'ADN en mesurant le poids moléculaire (PM en Kb)
- **Outils** : **Électrophorèse** sur gel d'**agarose** + Antibiotique induisant l'apoptose = Staurosporine
- **Puit 1** : Avec induction de l'apoptose et en présence d'un **ARN interférent** (cf. Biomol) dirigé contre l'**ARNm** du gène codant pour la **Caspase 3** (et qui va donc le détruire) -> au bout de 120min, l'ADN n'est pas fragmenté donc les cellules sont normales -> Expérience **Témoin** (elle témoigne de l'implication de la caspase 3 dans le phénomène apoptotique, car en son absence, et après induction de l'apoptose, le poids moléculaire ne varie pas)
- **Puits 2 à 6** : Sans induction de l'apoptose on observe les **mêmes résultats** qu'avant c'est à dire un **poids moléculaire stable** -> Cela est logique, car il n'y a pas d'**induction de l'apoptose** malgré la présence de la **Caspase 3**
- **Puits 7 à 11** : 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) qui représentent des **nucléosomes**

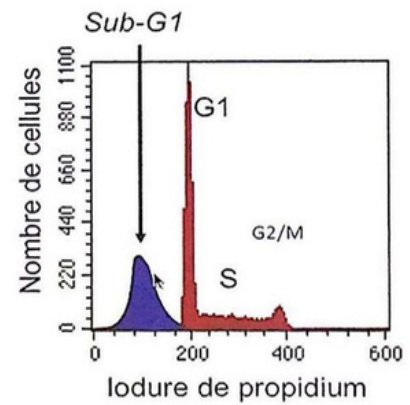
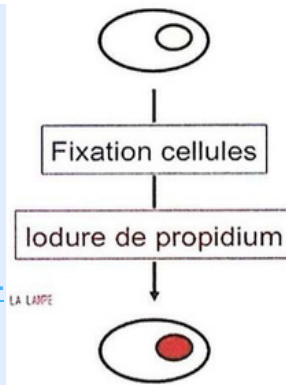
Caspase-3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Minutes	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	
Puits	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11



PS : Les conditions expérimentales ne sont pas à apprendre par coeur (rappelées le jour de l'exam) il faut surtout comprendre l'expérience

2ème technique : Technique du pic sub-g1 (#cycle cellulaire) 🚩

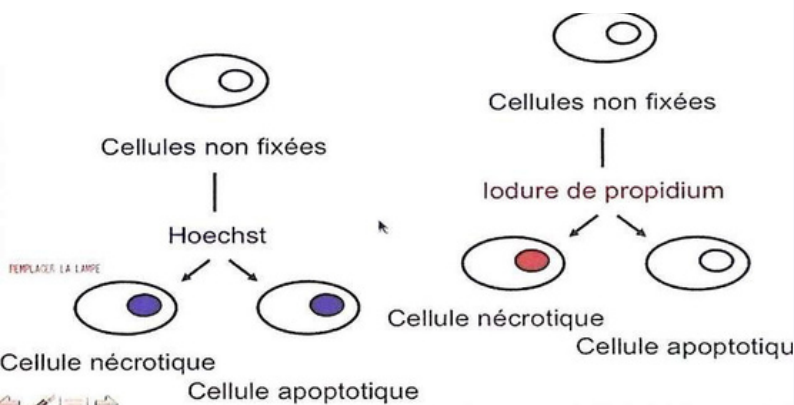
- **Principe** : Marquer les cellules par **cytométrie** et détecter la présence d'un nouveau pic précédent la phase G1 du cycle cellulaire = **sub-G1 = Apoptose**
- **Outils** : Utilisation d'un **colorant d'ADN = iodure de propidium = PI ++** sur des **cellules fixées**
- **Condition préalable** : **Fixer** les cellules ce qui permet de les **perméabilisées +** (la membrane de la cellule est perméable = perforé/troué permettant au colorant de rentrer)



→ La **fragmentation de la cellule** lors de l'**apoptose** entraîne la **perte** de certaines parties du noyau et donc du **matériel génétique** (par 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).

→ D'où la présence, du fait de l'apoptose, d'un pic supplémentaire = **pic sub-G1** (à gauche, en bleu), **caractéristique de la fragmentation apoptotique**.

c) Reconnaître une cellule **apoptique** via ses **modifications membranaires +++**



3ème technique : Technique du double marquage (toujours de la cytométrie)

- **Principe** : Distinguer les cellules **apoptiques** des cellules **nécrotiques**
- **Condition préalable** : utilisation de cellules **non fixées** donc **PAS de fixation = PAS de Perméabilisation des cellules++**
- **Outils** : Utilisation de **différents colorants**, Double marquage = **2 colorants** : **Hoechst + PI**

Hoechst = Colore les cellules apoptiques et nécrotiques avec une fixation égale

- 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)

Iodure de propidium = colore uniquement les cellules nécrotiques

- 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 double marquage Hoechst + PI 🚫🚫🚫 :

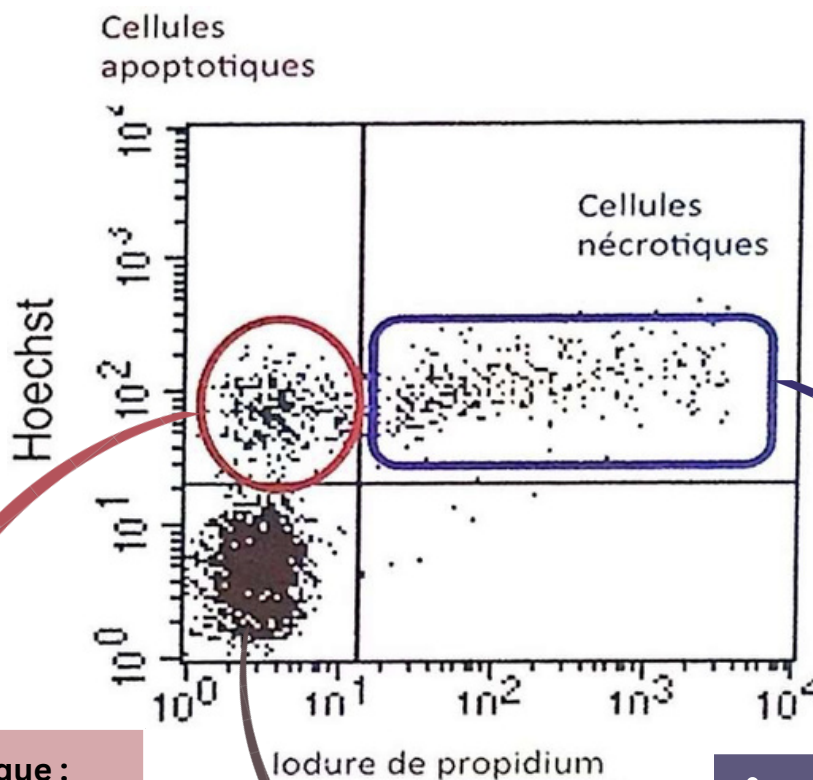
→ On observe par **cytométrie de flux**, la proportion de cellules colorées à l'**Hoescht** et à l'**iodure de propidium**. Chaque petit point représente une quantité de **fluorescence** :

- 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 au PI

⚠️ **À gauche de la barre verticale**, on considère que les cellules ne sont **PAS colorées par PI**.



⚠️ Les cellules "normales" sont incapable de fixer le Hoechst, uniquement les cellules nécrotiques et apoptotiques peuvent le faire

Cellule apoptique :

Elle fixe le colorant **Hoechst** **mais PAS PI +++** comme sa membrane, intègre, n'est **PAS permeabilisée**

Marge d'erreur :

Ici nous retrouvons des cellules qui n'ont **ni fixé PI, ni Hoechst**, car la fixation ne marche **pas toujours très bien** et le test n'est **pas 100% exact**

Cellule nécrotique :

Elle fixe le colorant **Hoechst ET PI+++** comme sa membrane perd son intégrité lors de l'**explosion de la cellule** et est donc **permeabilisée**

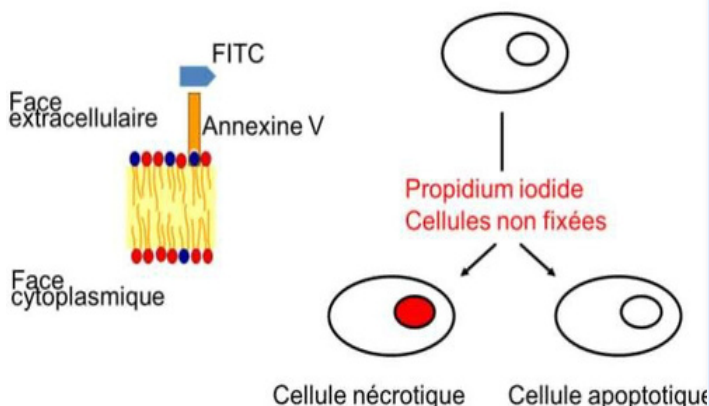
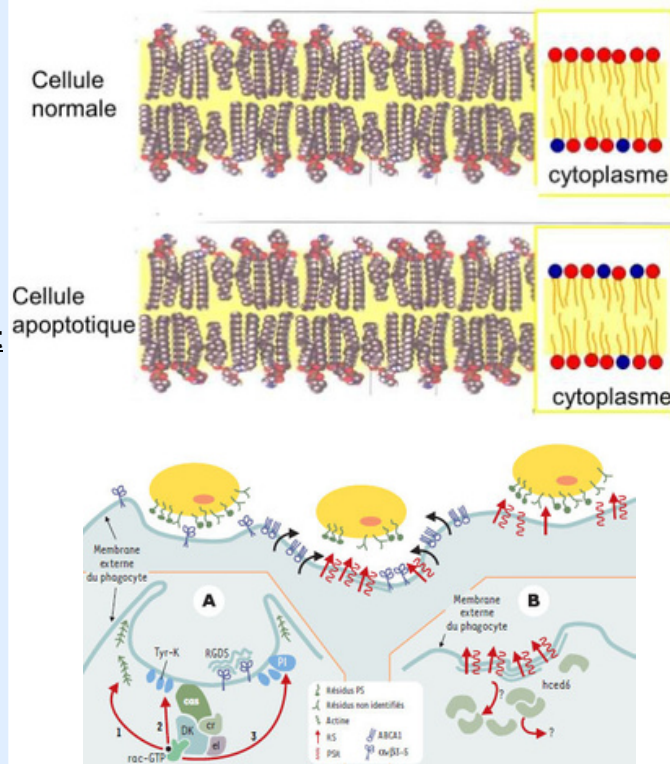
À apprendre par ❤️

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 (boules bleues) sur le **feuillet externe de la membrane** : **modification de la symétrie de la PS qui est extériorisée +++** **↑**
- **3)** La **PS** sera ensuite reconnue par les **cellules phagocytaires** (notamment les macrophages) pour être phagocytées : la **PS permet donc aux cellules apoptotiques d'être reconnues**

→ Propriété utilisée en **cytométrie**

externalisation des phosphatidylsérines



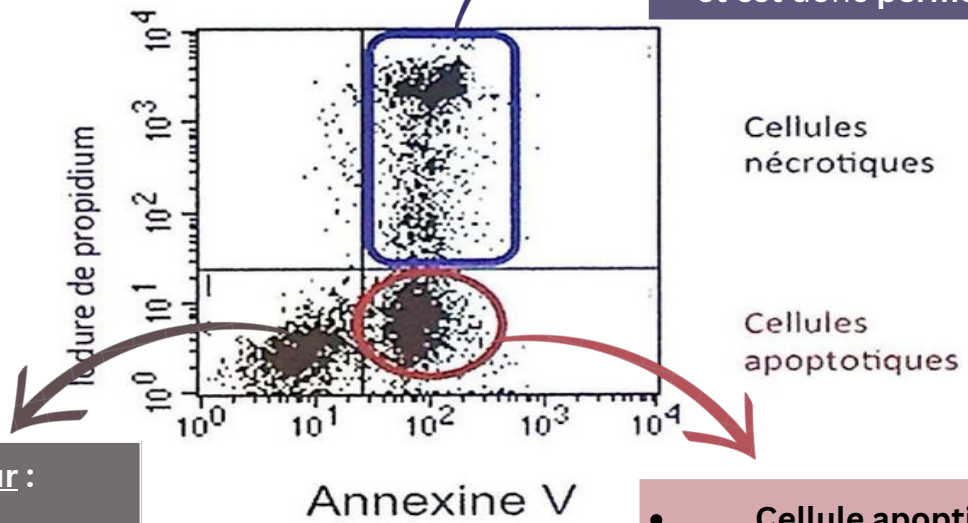
Technique : Double marquage PI + Annexine 5

- **Principe** : Distinguer les cellules **apoptiques** des cellules **nécrotiques**
- **Outils** : Utilisation de 2 colorants : **PI + Annexine 5**
- Pourquoi l'**Annexine 5** ? C'est une protéine spécifique que l'on couple à un **fluorochrome** afin de reconnaître la **PS**. Cependant, comme la cellule nécrotique **explose**, la **PS se retrouve également externaliser +++**. C'est pour cela qu'on utilise aussi PI car celui-ci ne colore que les cellules **nécrotiques** (par perte d'intégrité membranaire)

Résultats double marquage PI + Annexine 5 🚩🚩🚩 :

⚠️ **PI** se repère maintenant au niveau des **ordonnées**
Alors que **l'Annexine 5** se trouve en **abscisse**

• **Cellule nécrotique :**
Elle fixe **l'Annexine 5**
ET PI +++ comme sa membrane
perd son intégrité lors de
l'explosion de la cellule
et est donc **permeabilisée**

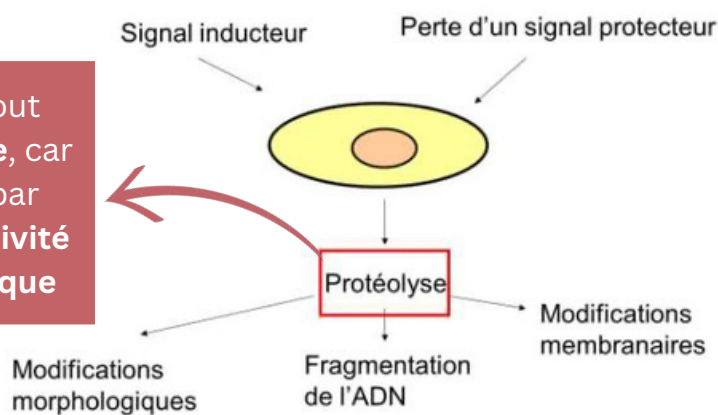


• **Marge d'erreur :**
Ici nous retrouvons des
cellules qui n'ont **ni fixé PI,**
ni l'Annexine 5, car la fixation
ne marche **pas toujours très**
bien et le test n'est **pas 100%**
exact

• **Cellule apoptique :**
Elle fixe **l'Annexine 5**
mais PAS PI +++ comme sa
membrane, **intègre,** n'est **PAS**
permeabilisée

Récap Techniques + Colorations 🚩🚩🚩 :

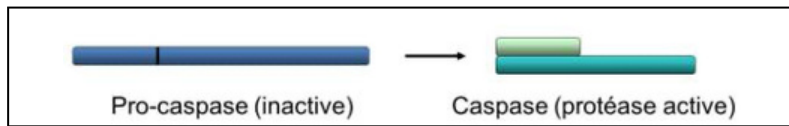
• C'est la que réside tout
l'objectif de l'**apoptose,** car
la cellule se détruit par
protéolyse via une **activité**
protéolytique spécifique



	Hoechst	Iodure de Propidium	Annexine V
Normal	⊖	⊖	⊖
Apoptique	⊕	⊖	⊕
Nécrotique	⊕	⊕	⊕

d) Reconnaître une cellule **apoptique** via la **protéolyse ++**

Ce qui va vraiment déclencher cette mort cellulaire par **apoptose**, c'est l'activation de la **protéolyse**. La **protéolyse** correspond à la **dégradation** des protéines via d'autres **protéines spécifiques**. Ainsi, l'apoptose se met en place à l'aide de **caspases + ↑**. À l'état **normal**, elles ne sont **PAS actives**.

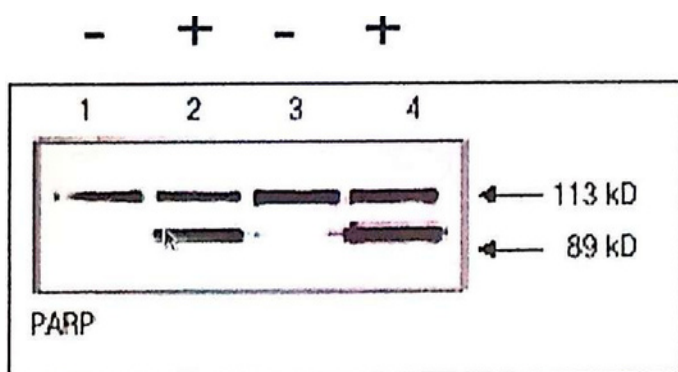


1) Le rôle des Caspases :

Il en existe **2 types** :

Les caspases initiatrices	Les caspases effectrices
Caspases 8, 9 et 10 .	Caspases 3, 6 et 7 .
Elles sont activées par récepteur de mort ou par auto-activation . Ce sont les protéases initiatrices 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 cibles :



ex: PARP, reconnaissance des dommages

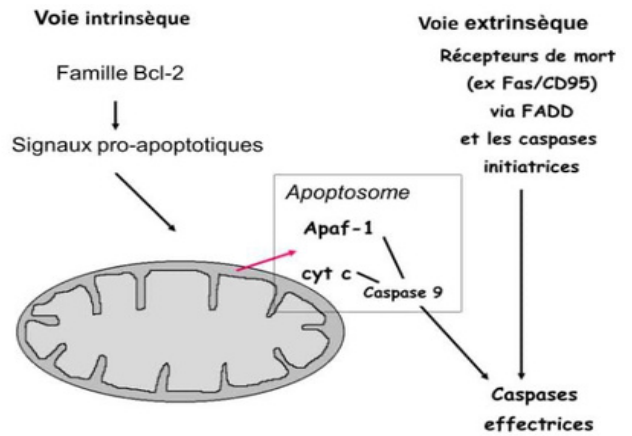
- En gel de **polyacrilamide SDS**, on observe :
 - **Piste 1 et 3** : SANS induction des caspases effectrices, la protéine PARP est **intacte**, pas de **clivage**
 - **Piste 2 et 4** : AVEC induction des caspases effectrices, on observe **2 bandes**, donc il y a eu **clivage** de la protéine PARP = **apoptose**

2) Le rôle des Mitochondries :

- Les **mitochondries** sont les usines biochimiques de la cellule. Elles produisent la majeure partie de **l'ATP**.
- Elles constituent également la réserve de **cytochrome c ↑ ++**, une molécule essentielle dans la majorité des processus **apoptotiques**.

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

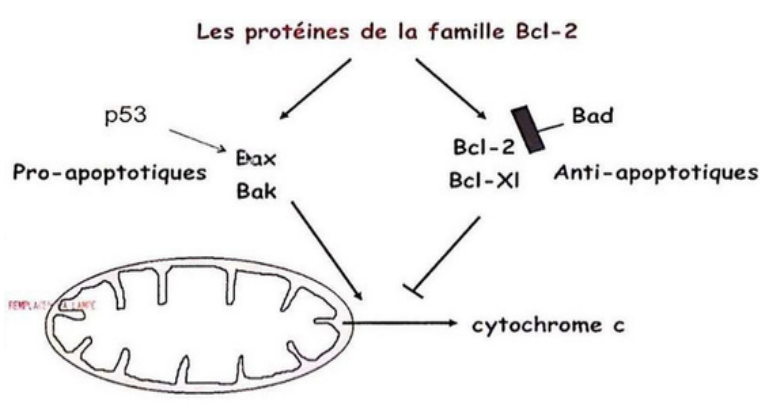
- Voie **intrinsèque** 📌 +++
- Voie **extrinsèque** 📌 +++



--> Voie **intrinsèque** = Voie **Intracellulaire** = Voie **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**.

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



-> La libération de **Cytochrome C** est sous le **contrôle des membres de la famille 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 la **caspase 9** **initiatrice**
- 6) Elle-même activant une **caspase effectrice**
- 7) **Fragmentation** de la chromatine, la lamine, le cytosquelette...

--> Voie **extrinsèque** = Voie **extracellulaire** = Voie **mitochondrie INdépendante ++**

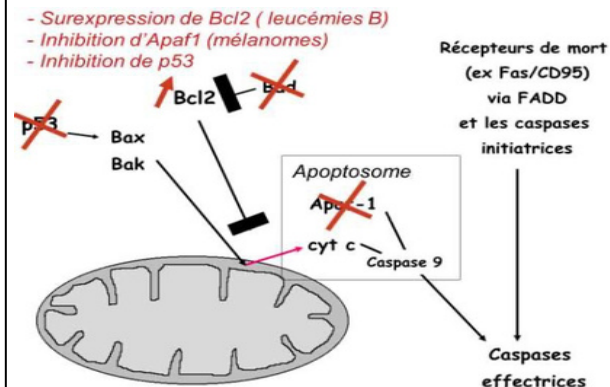
- Cette voie répond à des signaux **extérieurs à la cellule** par des **récepteurs de mort** appartenant à la super famille des **récepteurs au TNF** (**Fas + F+**/CD95) via des **protéines intra-cytosoliques** (FADD).
- Ainsi, la voie extrinsèque est « **mitochondrie indépendante** » car ce n'est plus la mitochondrie mais des protéines intracytosoliques comme le **FADD** qui interviennent dans le processus apoptotique.
- Celles-ci vont cliver les **caspases initiateurs**, puis une **caspase effectrice**, qu'elle **active** en conséquence. Cela provoquera la **fragmentation** de la chromatine, la lamine, l'actine du cytosquelette...
-> Même processus, ce sont juste les **acteurs initiaux** qui diffèrent selon la voie afin d'aboutir à l'activation des **caspases**

Intérêt en médecine : Pathologie cancéreuse

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 de protéines anti-apoptotiques** (ex: BCL2)
-> leucémie B.
- **Inhibition de l'apoptosome**
- **Inhibition d'APAF-1** -> mélanomes.
- **Inhibition de P53**



DÉDIS TIME (LES #GIGIDIS)

- Dédi a VOUS pour avoir bossé le meilleur cours de biocell et celui qui tombe toujours
- Dédi à la TTR et aux QCMSHokobon (ou Chocolat Bonbon pour les intimes 🤪)
- Dédi au Make you move qui à fait vibrer un amphi ENTIER à la TTR cette année
- Dédi a mes P1 préférés qui ont redansé avec nous après l'EB1 (1ère photo juste en bas), hâte de vous revoir à l'EB2 pour danser a nouveau
- Dédi à la rentrée médecine, c'est chiant mais on fais ce qu'on peut hein
- Dédi au premier cours de P2 qui n'a jamais eu lieu
- Dédi à ma rentrée au club de patins que j'ai ADORE
- Dédi au filtre Snap qui sont hilarant
- Dédi à la reine Jiafei (et a ses exploits) qui à ambiacé nos cours d'informatique en LAS2SV (petite anecdote, mais la photo que vous voyez à fini en fond d'écran sur tout les ordi de la salle de TP info voilà)
- Dédi au pauses café qui ont refait toute mes années d'études en fait (Marina quand est ce qu'on se revoie tu me manques)
- Dédi a roblox et tout les délires qui y passent (SI vous voulez jouer, n'hésiter pas)
- Dédi a tiktok, au édits super beau et hilarant, mais surtout dédi au Floptok et au twitter stan's
- Pour finir (le meilleur pour la fin), Dédi a GIGI qui nous a transmis ces formidables connaissances et dédi a la dynastie biocell que j'admire profondément (#Chiara, #Noé, #Leho, #Tom, #Milan, #Yamina, #Alina et tant d'autres qui se sont battus au nom de la biocell)

