

UE2 : Biologie cellulaire

Chapitre 1 :

L'apoptose ou mort cellulaire programmée

Professeur François BERGER

Année universitaire 2010/2011

Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés.

Plan

- Introduction - définitions
- Description morphologique
- Bases moléculaires de l'apoptose
- Techniques d'étude de l'apoptose
- Exemples physiologiques et pathologiques

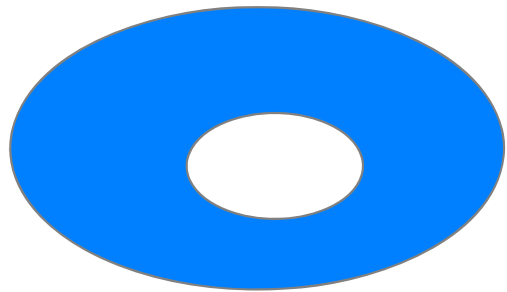
Historique :
Kerr 1972

Définition :

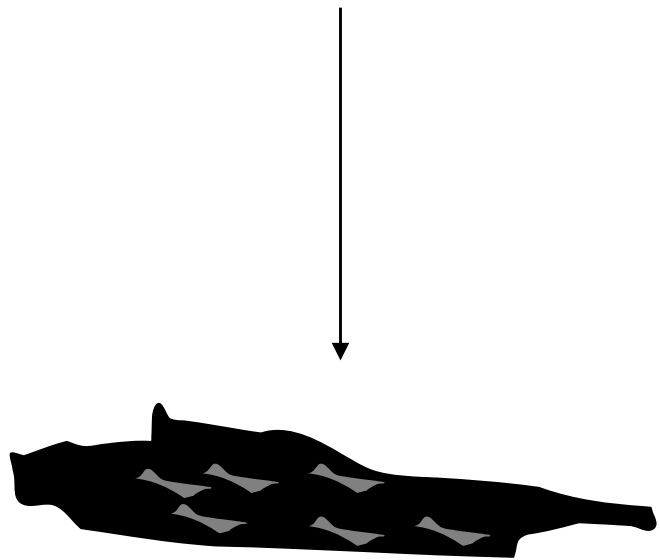
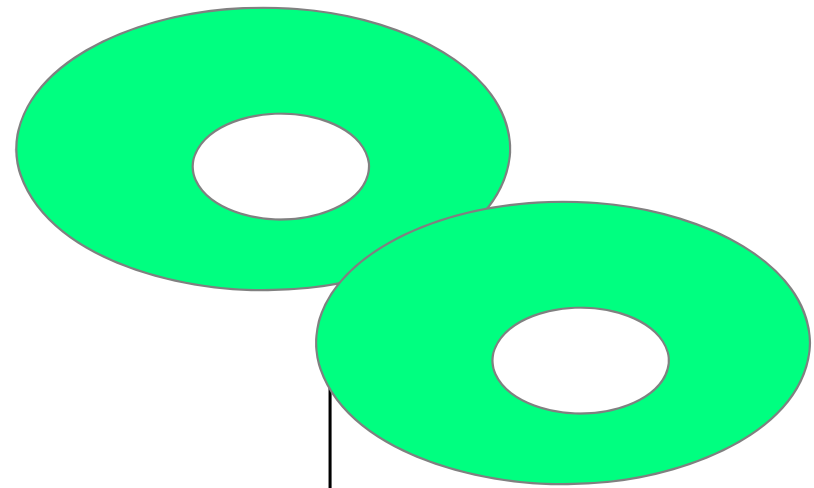
- Le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : **apo** pour éloignement, **ptose** pour chute.
- Notion de programme
- Implications majeures en physiologie et en pathologie

Situation de l'apoptose par rapport à la physiopathologie cellulaire

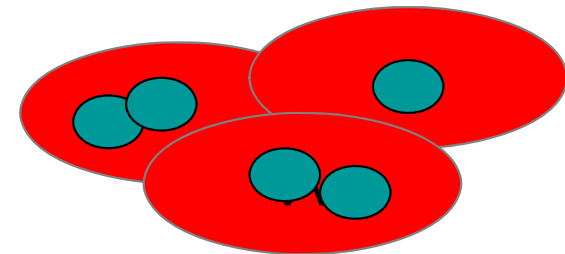
État différencié



Renouvellement cellulaire



Maladies dégénératives



Cancer

Description morphologie de l'apoptose

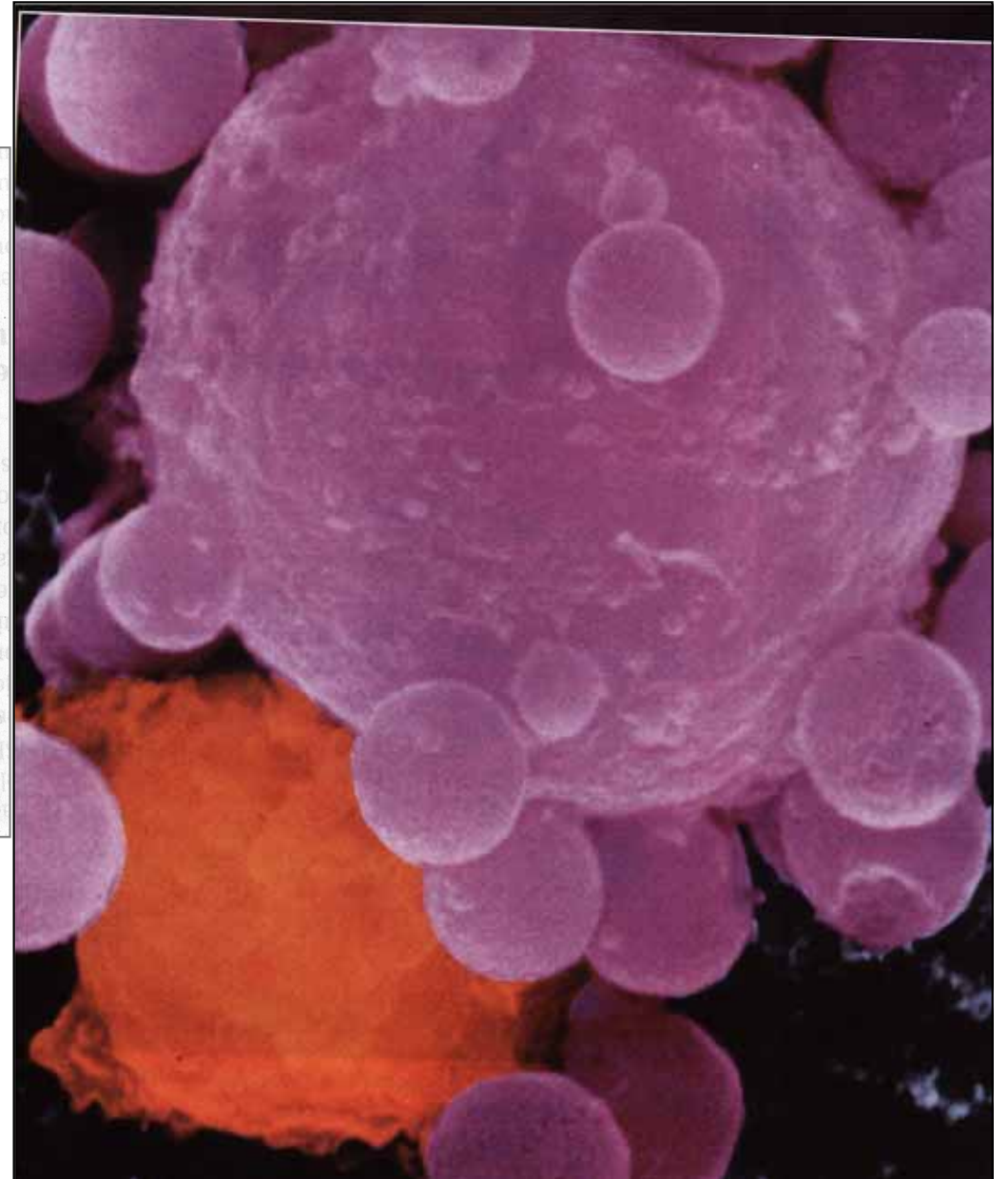
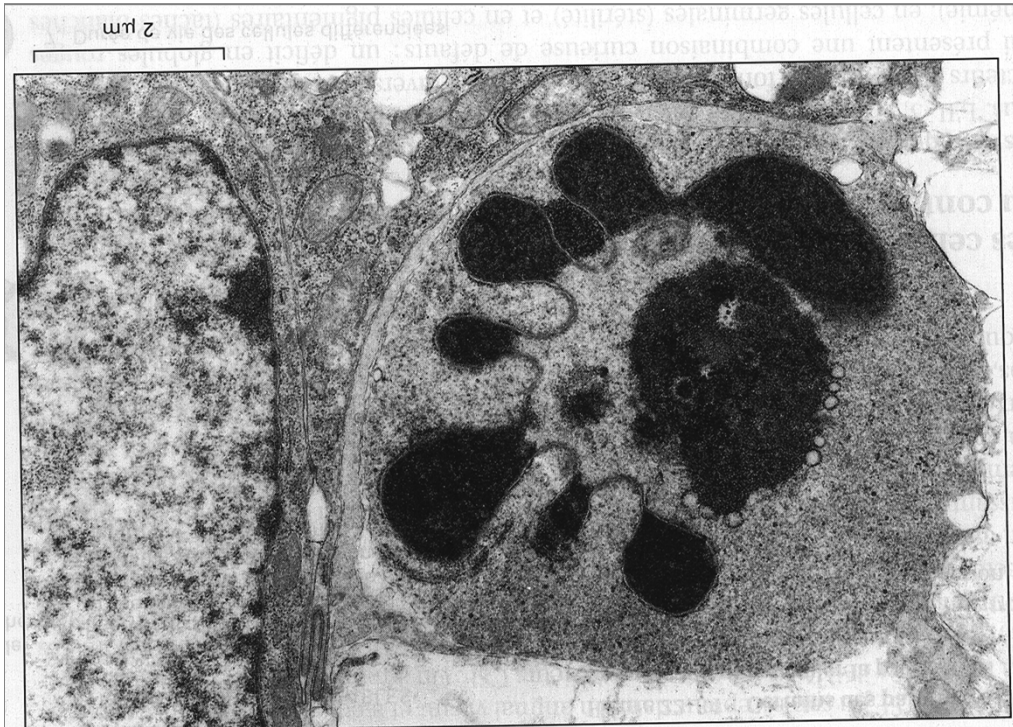
- A la différence de la nécrose, l'apoptose affecte en général des **cellules isolées**, aboutissant à un processus de condensation et de fragmentation.
- Les premières manifestations morphologiques se caractérisent par une **compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire, une convolution des membranes nucléaire et cytoplasmique, une condensation du cytoplasme.**

- Le noyau se fragmente ensuite, chaque fragment entouré d'une double enveloppe.
- Des **corps apoptotiques** (éléments cytoplasmiques et nucléaires) sont ensuite relargués, et vont être **phagocytés** par les cellules voisines, **sans aucune réaction inflammatoire**.

Nécrose versus apoptose

	Nécrose	apoptose
Causes	Anoxie, dommages physiques ou chimiques	Déplétion en facteurs de croissances hormonale, lésions ADN
modifications nucléaires		condensation segmentation fragmentation
modifications membranaires	Lyse	protusion
modification mitochondriales	gonflement	
biochimie		modifications actives de l'expression des gènes et des protéases

Apoptose d'une cellule cancéreuse par un lymphocyte T cytotoxique



Bases moléculaires de l'apoptose

- C elegans
- 1090 cellules sont produites et 131 meurent pendant le développement
- 3 gènes sont nécessaires pour la mort de ces 131 cellules:
 - ced-3
 - ced-4
 - ced-9

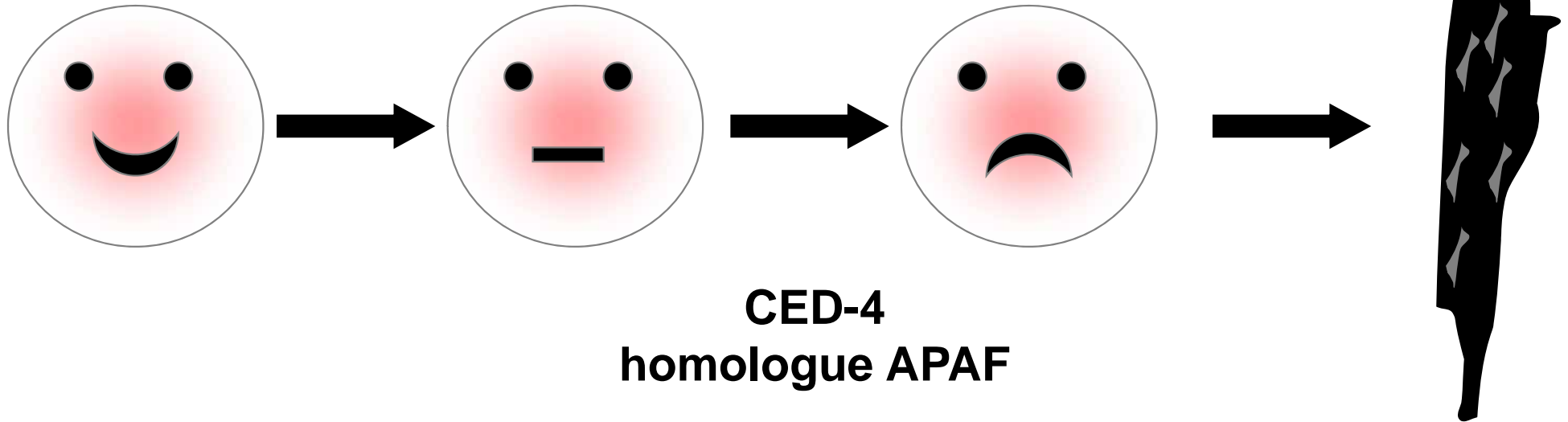
ced-9 ---] ced-4 ---> ced-3 ---> mort cellulaire

1090 cellules

Cellule engagée
vers l'apoptose

En cours
d'apoptose

Cellule
morte
phagocytée



CED 9

CED 3

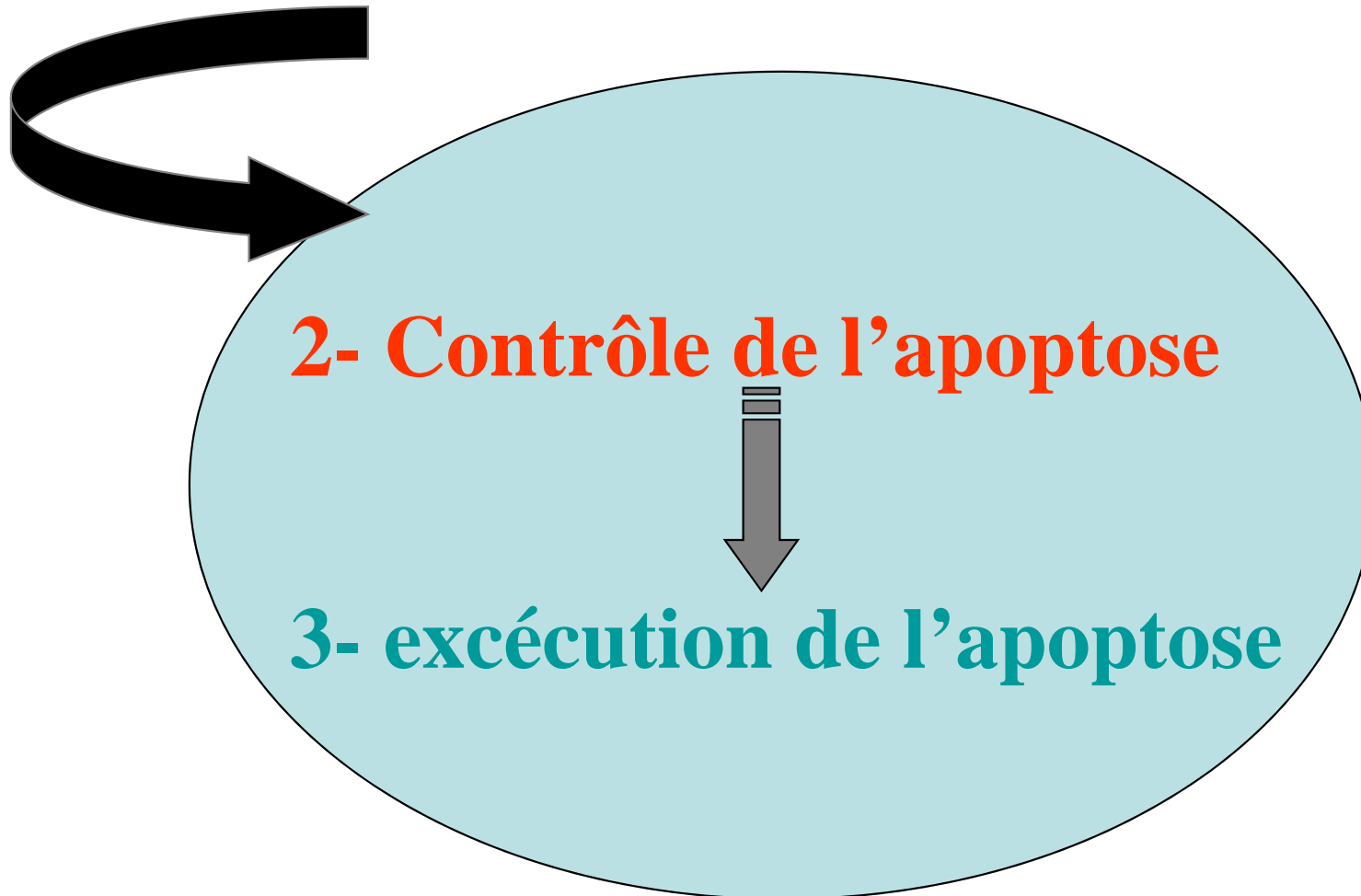
Homologue
de Bcl-2

Homologue
des caspases

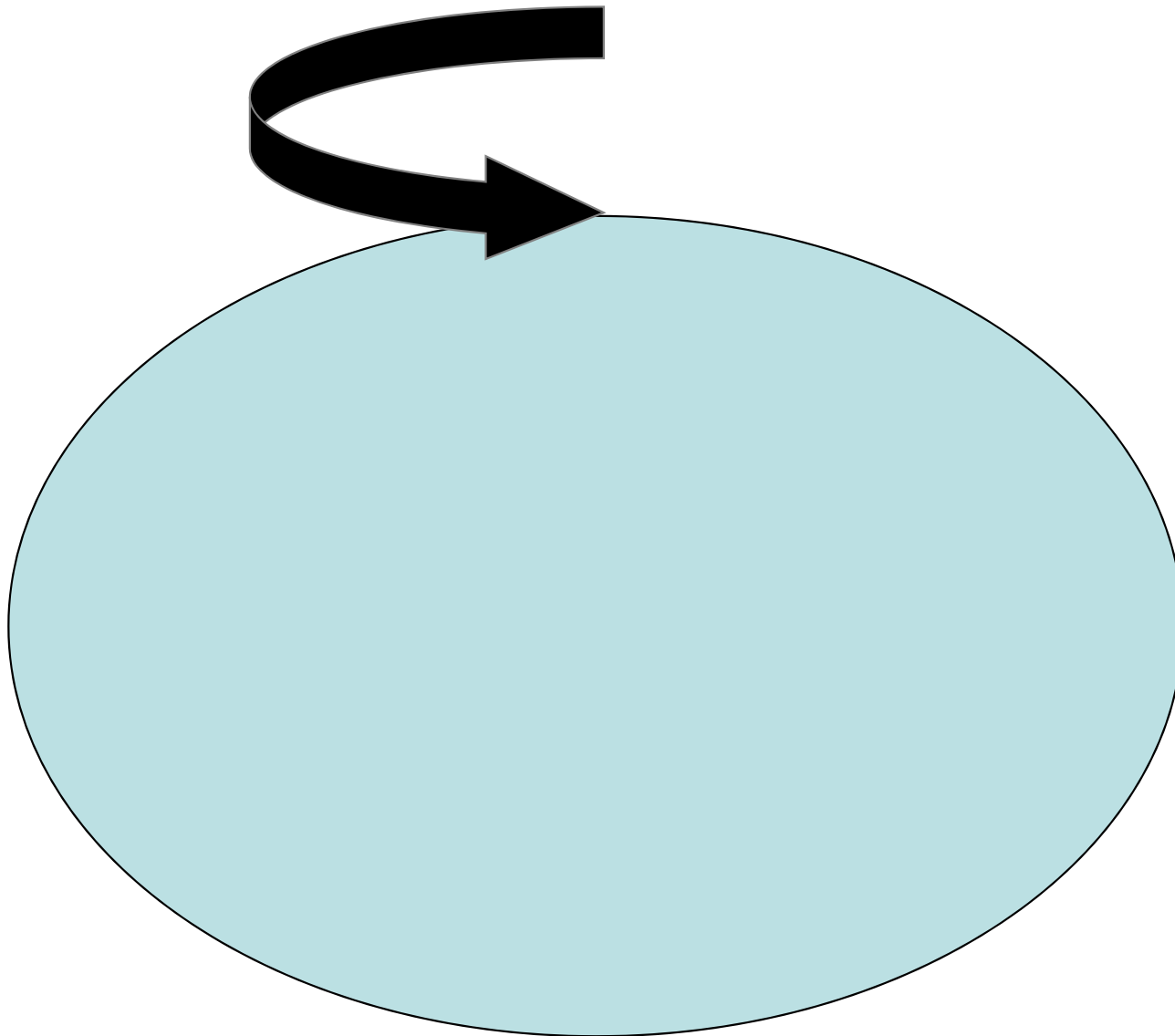
959 cellules

Modélisation de l'apoptose

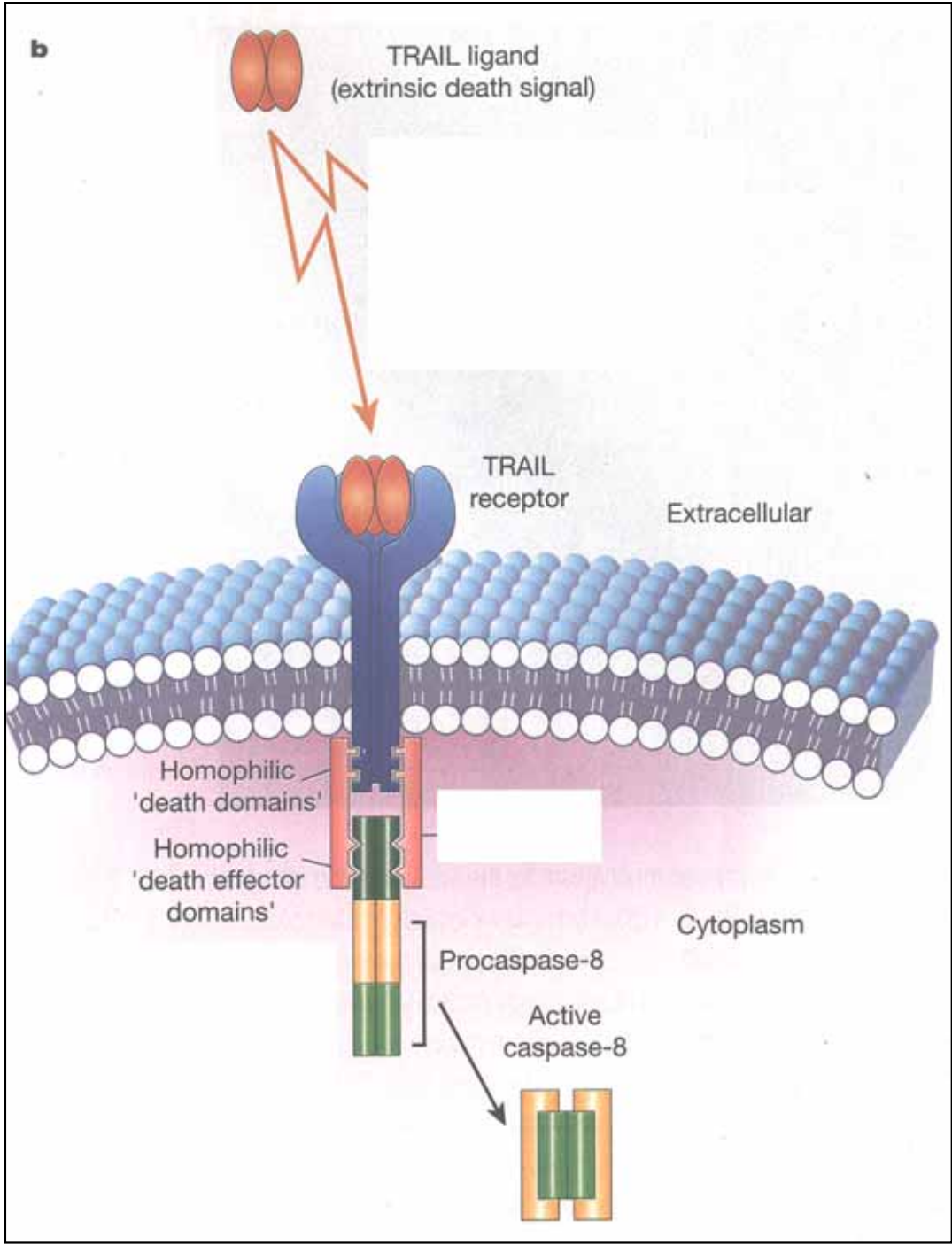
1- Signal apoptotique



1- Signal apoptotique



- Privation en facteurs de croissance, hormonale
- stress
- Lésions de l'ADN
- Fas, TNF alpha
- Perforine, Granzyme B



2- Contrôle de l'apoptose

- **Bcl-2**
- **Bax**

Notion de protéine anti-apoptotique : Bcl-2

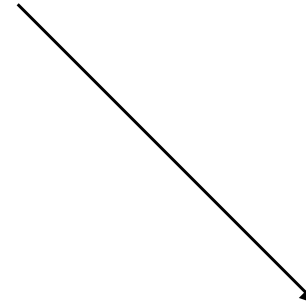
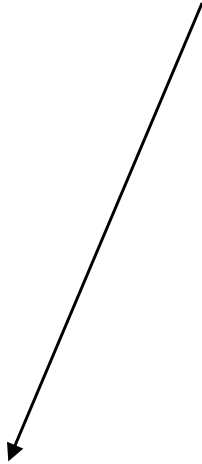
- Homologue de Ced-9
- Protéine connue depuis 1985 pour sa surexpression dans un type particulier de lymphome
- s'oppose à la mort cellulaire

Notion de protéine pro-apoptotique

- **BAX**

Bcl-2

BAX



État pro-apoptotique

Etat anti-apoptotique



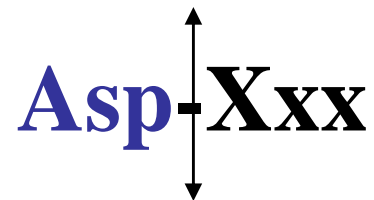
3- excécution de l'apoptose

- **Caspases**
- **Mitochondrie**

Les caspases

- Protéases
- A cystéine
- Effecteur ultime et principal de toutes les voies de transduction du signal apoptotique

- Analogue de Ced 3
- Site actif catalytique clivant au niveau de résidus aspartates
- Famille de molécules
- Existent sous forme de pro-enzymes inactives
- Activation en cascade



- Substrat :
 - protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire
 - Endonucléases
- La neutralisation des caspases diminue l'apoptose

La mitochondrie

- Contient de nombreux facteurs pro-apoptotiques (ex : AIF, apoptosis inducible factor)
- cytochrome C

Induction de l'apoptose

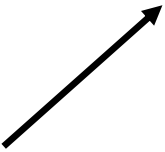


Mitochondrie



Modifications de perméabilité membranaire

Bcl-2 / Bax



Cytochrome C

**Facteur AIF
(apoptosis inducing
Factor)**



Caspases

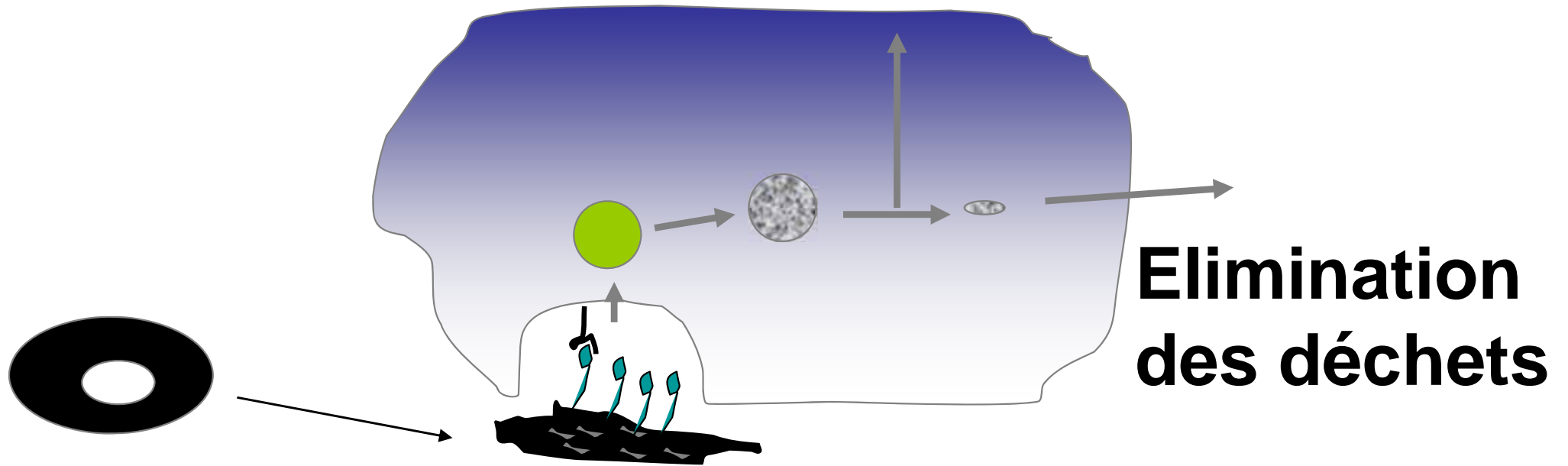


Execution de l'apoptose

Élimination des cellules mortes par les macrophages

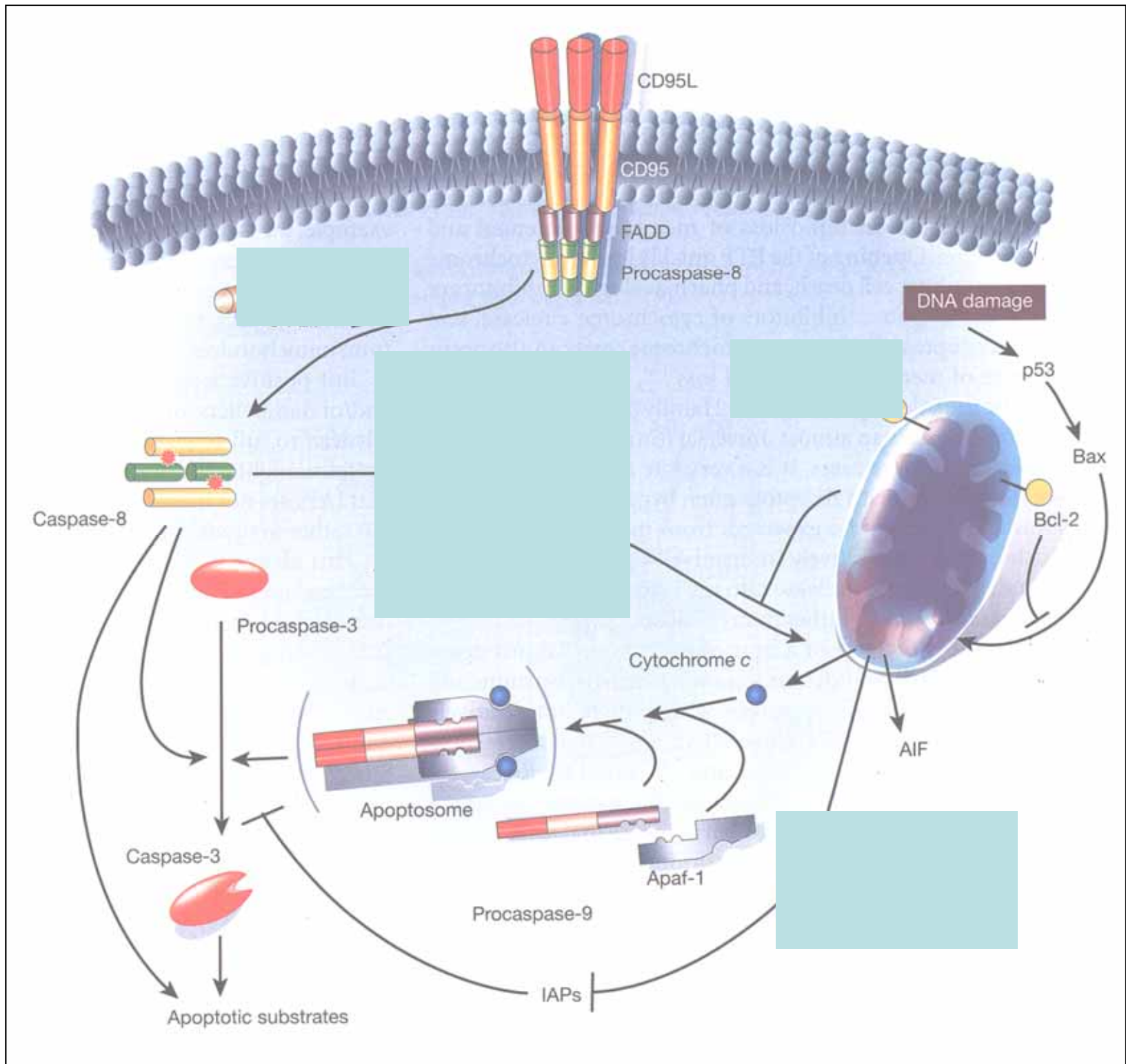
- Prévenir la toxicité des produits intracellulaires
- mécanismes de reconnaissance
- dégradation et élimination
- Suppression de l'inflammation

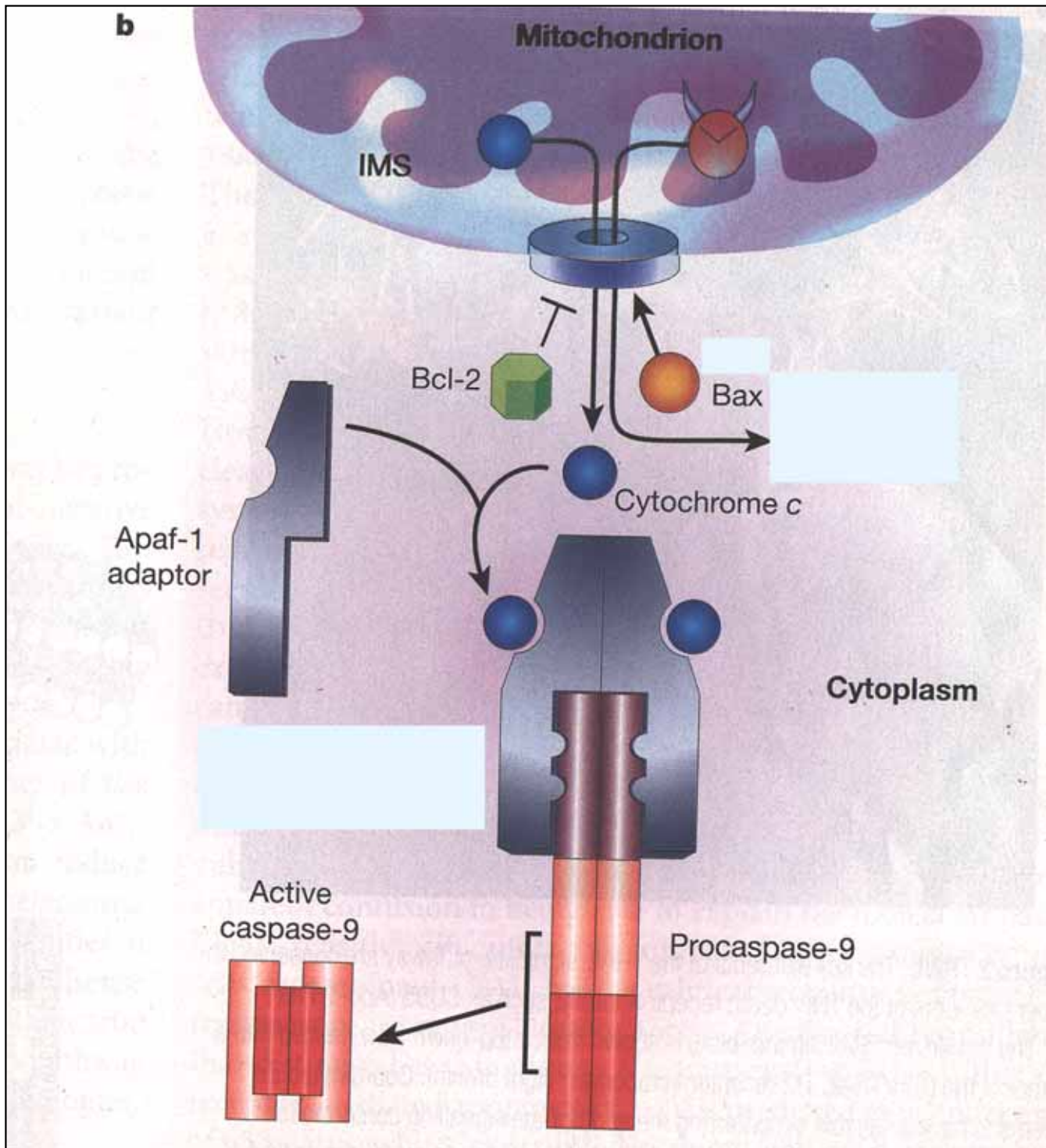
Présentation au système immunitaire



« Eat me flags »

- Il existe deux voies pour l'apoptose
- Une voie intrinsèque
- Une voie extrinsèque





- Les différents niveaux de la voie de l'apoptose interagissent entre eux

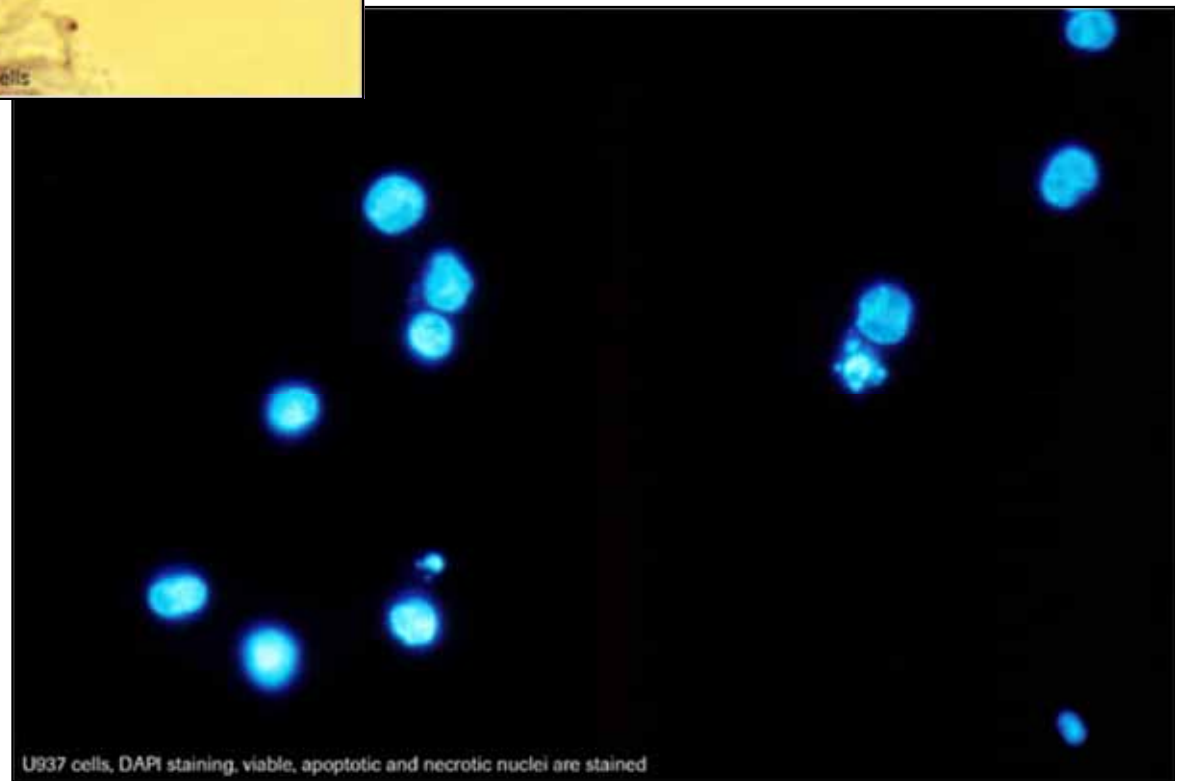
Techniques d'étude de l'apoptose

- Anomalies morphologiques
- Fragmentation de l'ADN
- Activation des protéases
- Altérations de la membrane

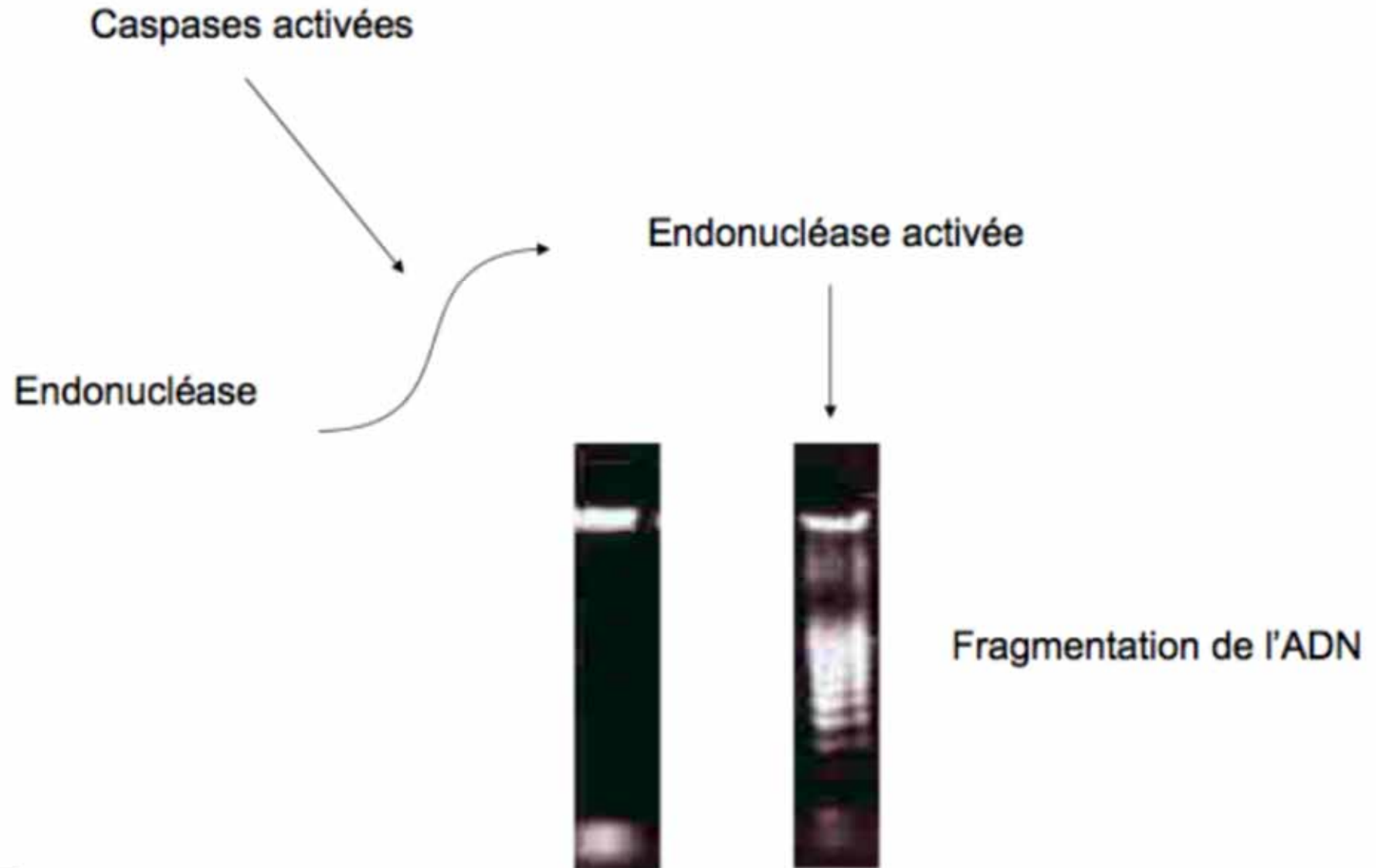
Morphologie



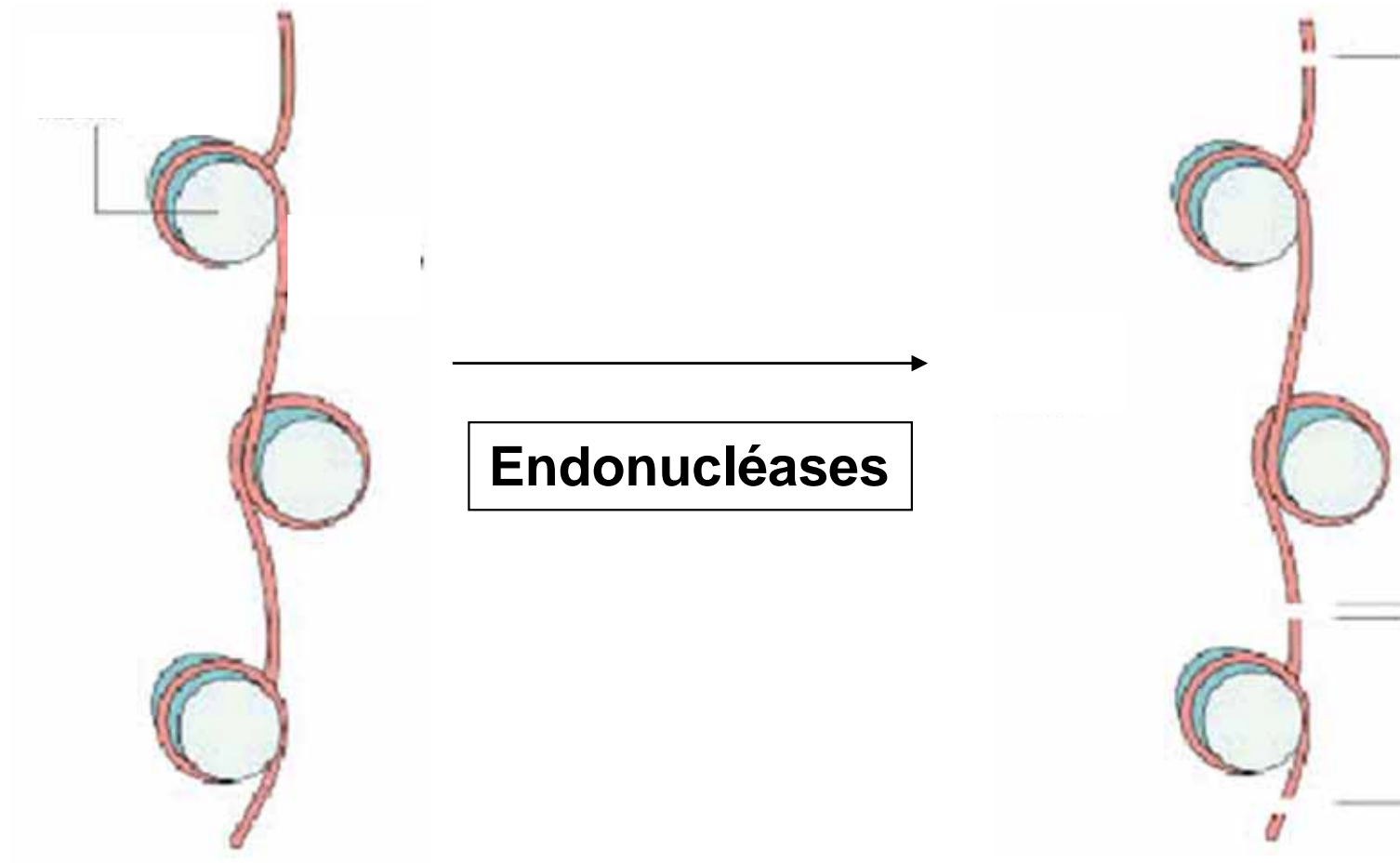
Coloration nucléaire



Activation des endonucléases



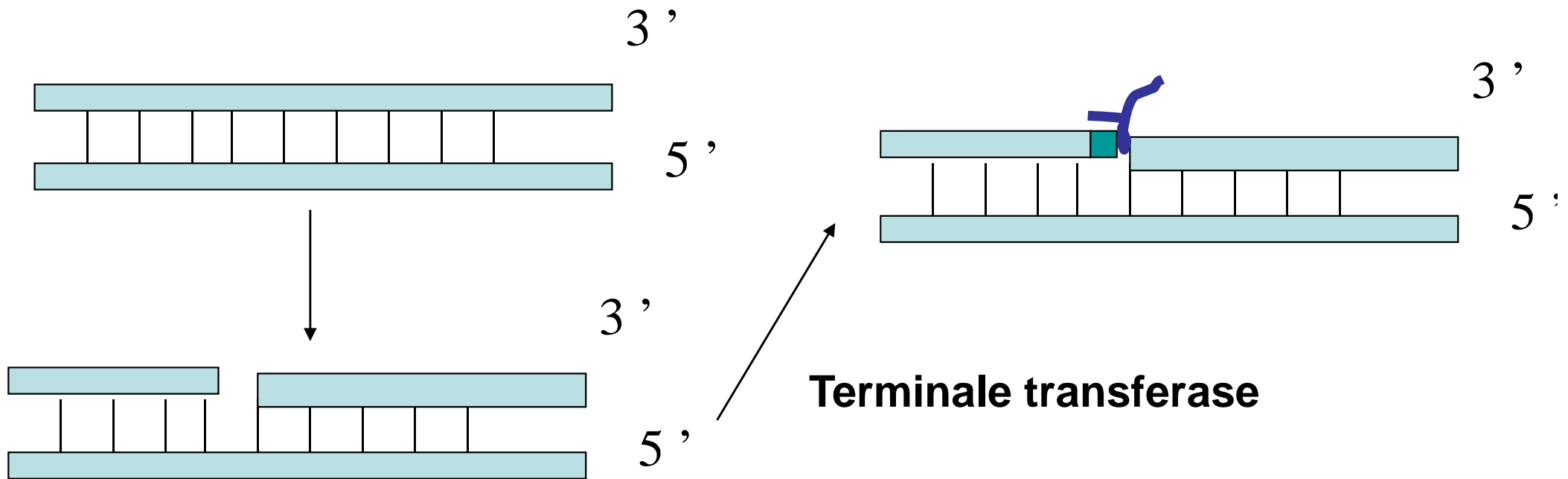
Fragmentation de l'ADN

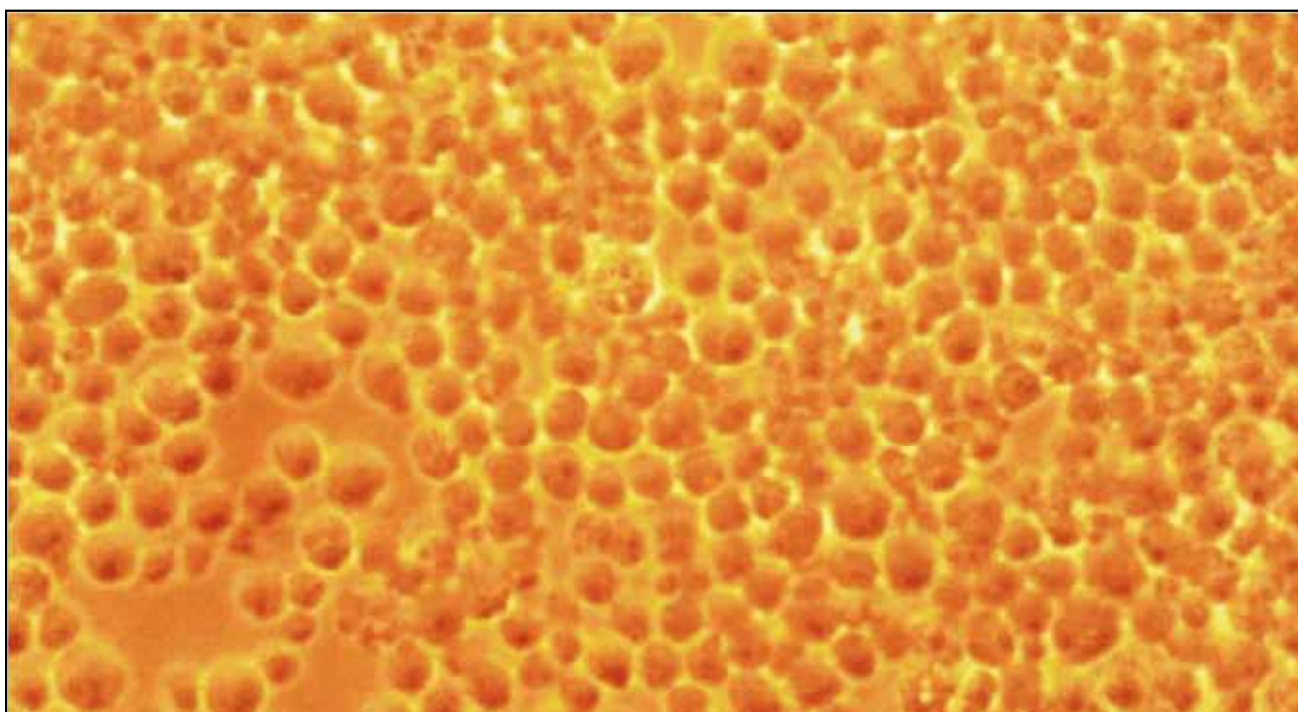




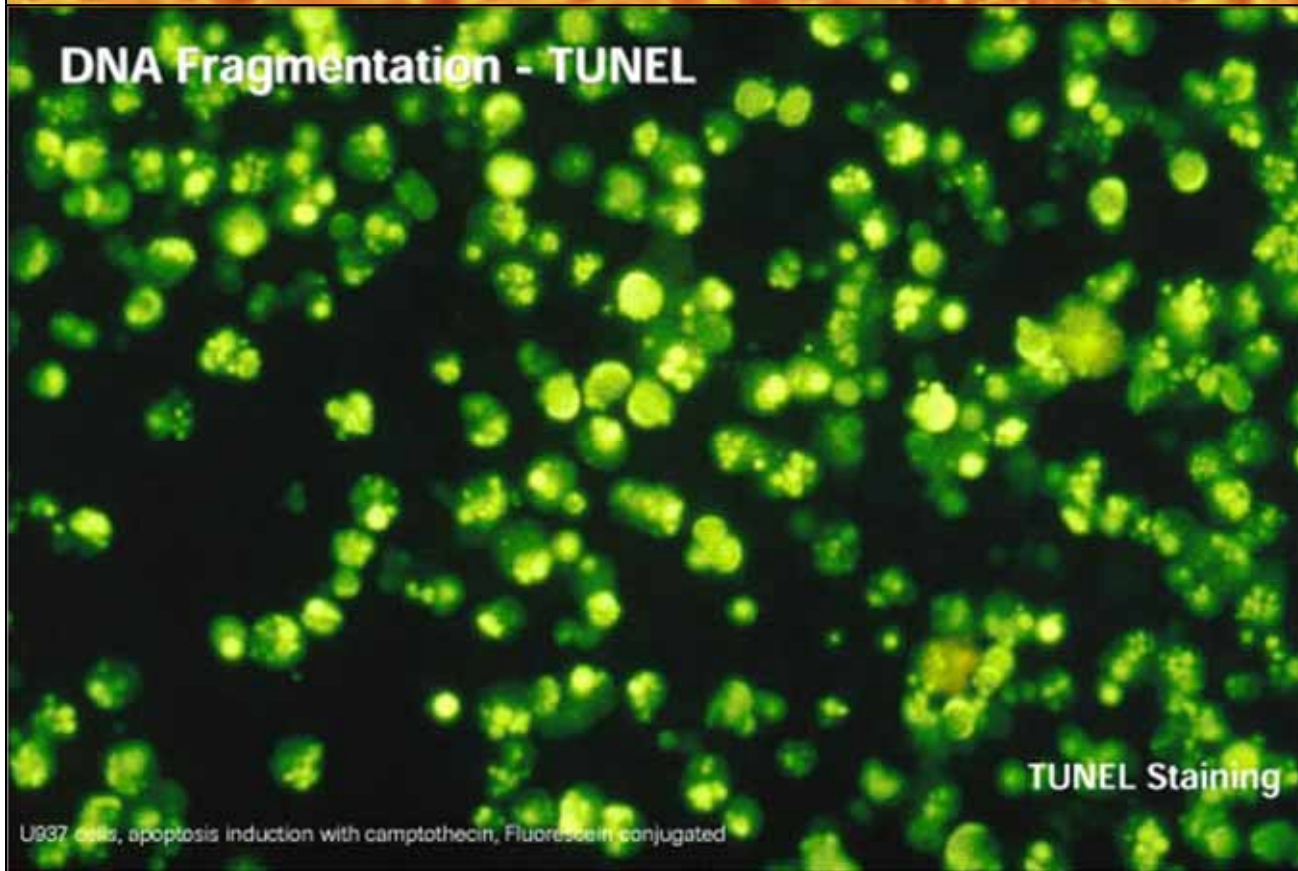
Aspect en échelle
de l'ADN
fragmenté

Marquage des fragments d'ADN fragmentés et repérage in situ



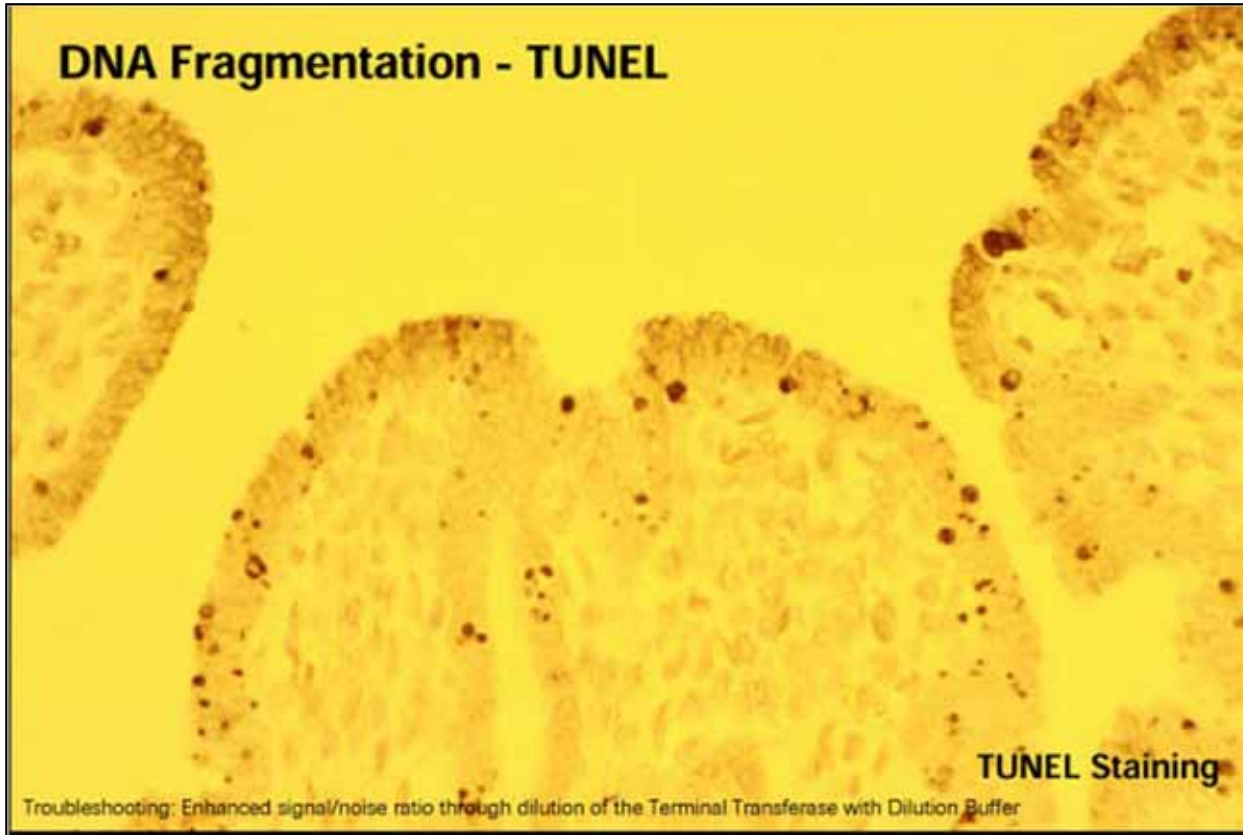


DNA Fragmentation - TUNEL



U937 cells, apoptosis induction with camptothecin, Fluorescein conjugated

DNA Fragmentation - TUNEL



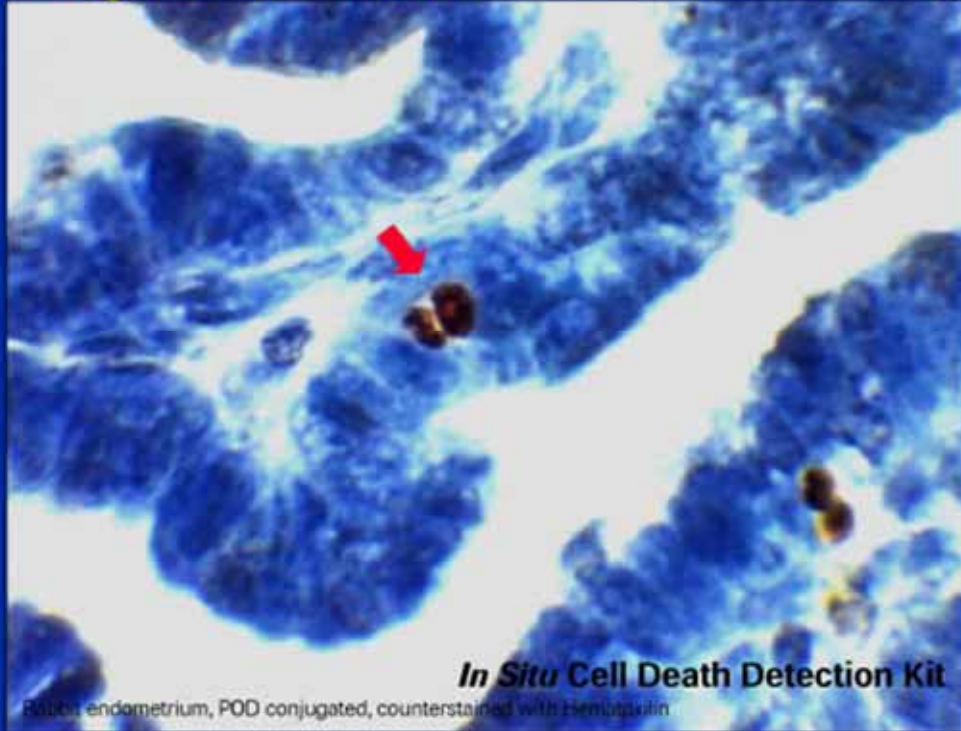
TUNEL Staining

Troubleshooting: Enhanced signal/noise ratio through dilution of the Terminal Transferase with Dilution Buffer

DNA Fragmentation - TUNEL

Roche

Diagnostics



In Situ Cell Death Detection Kit

Rabbit endometrium, POD conjugated, counterstained with hematoxylin



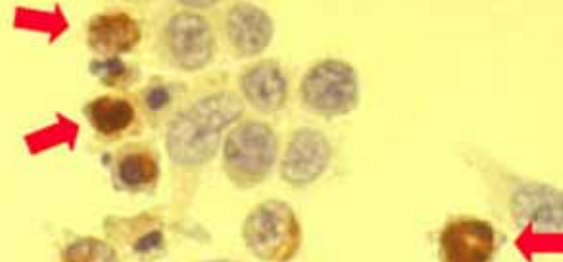
- TUNEL

In Situ Cell Death Detection Kit

Rat spinal cord, POD conjugated, double staining

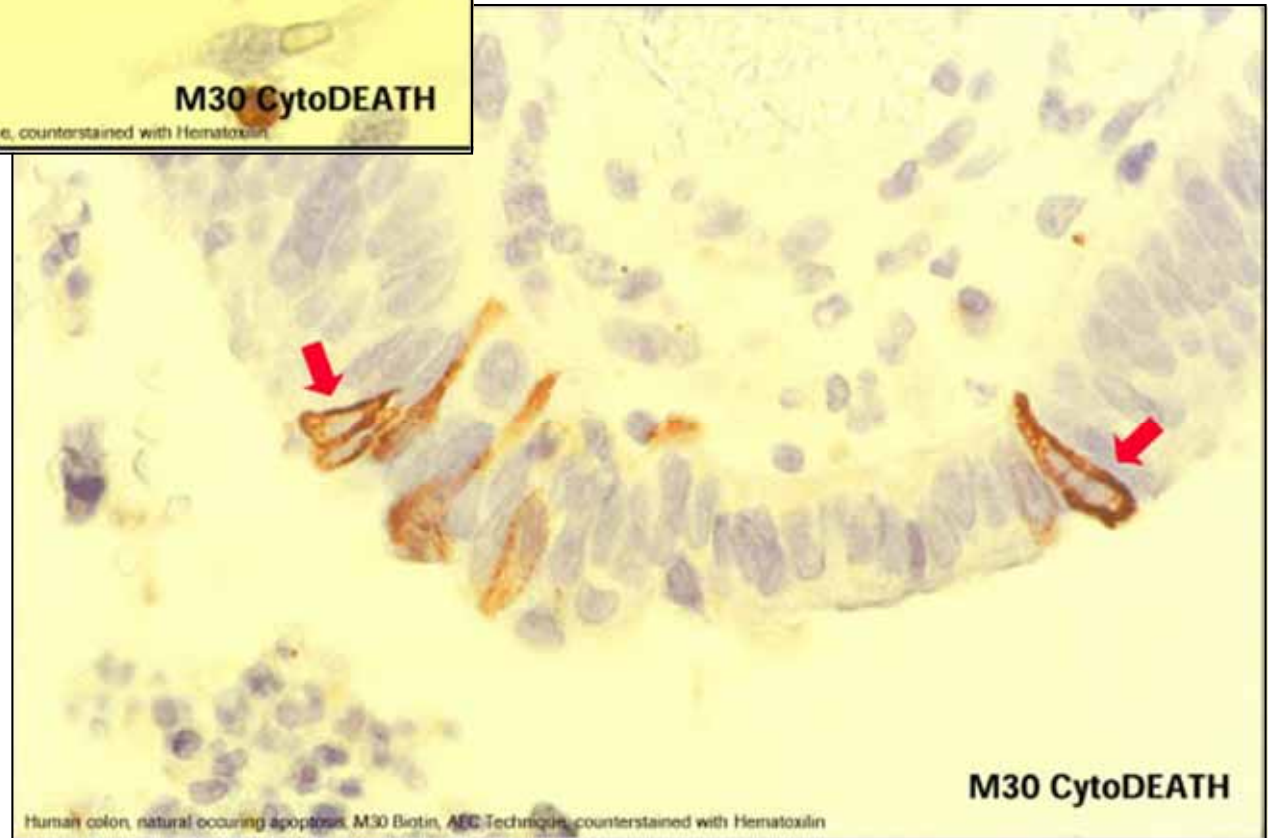
Activité caspase

Caspase Activity



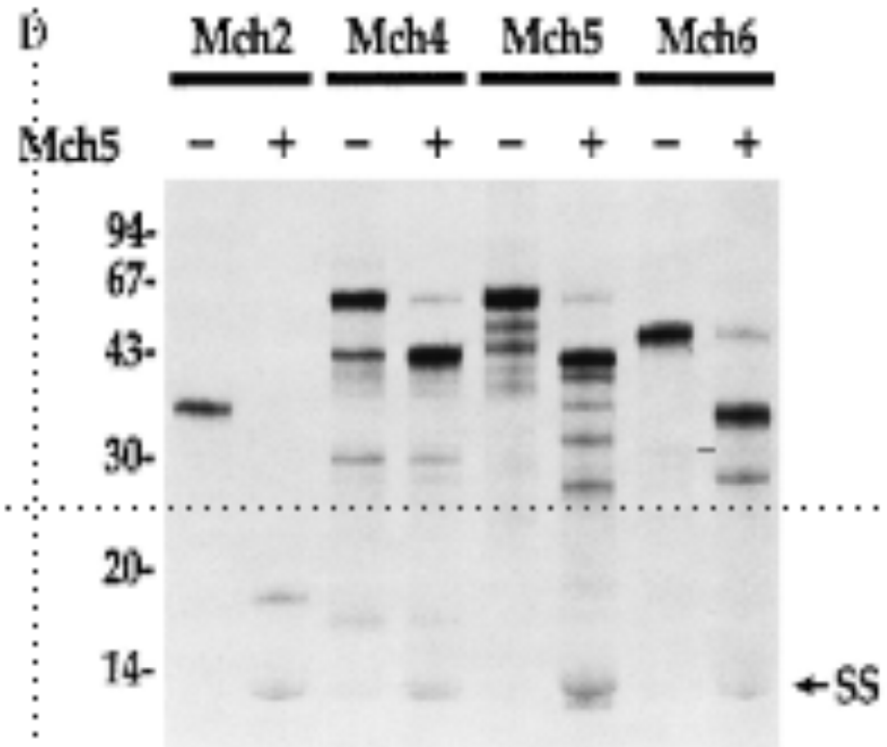
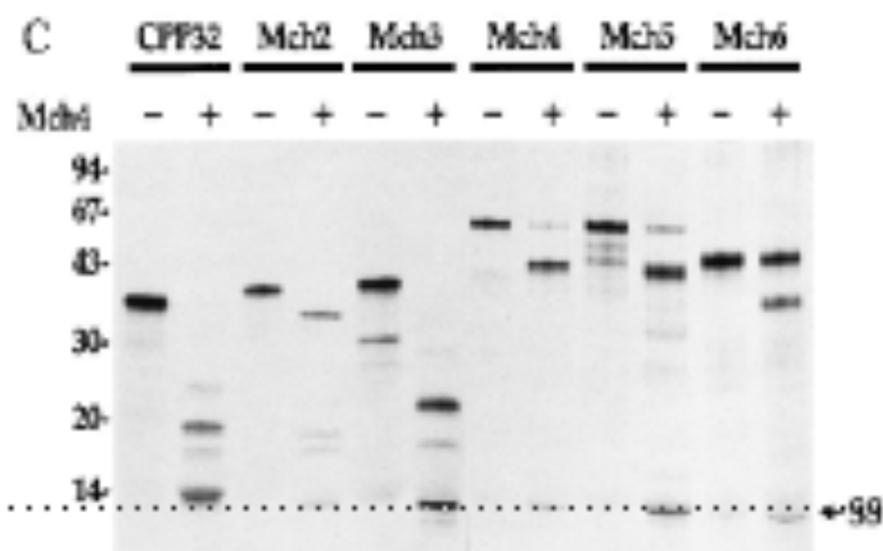
M30 CytoDEATH

HeLa Cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D, M30 Biotin, AEC Technique, counterstained with Hematoxylin



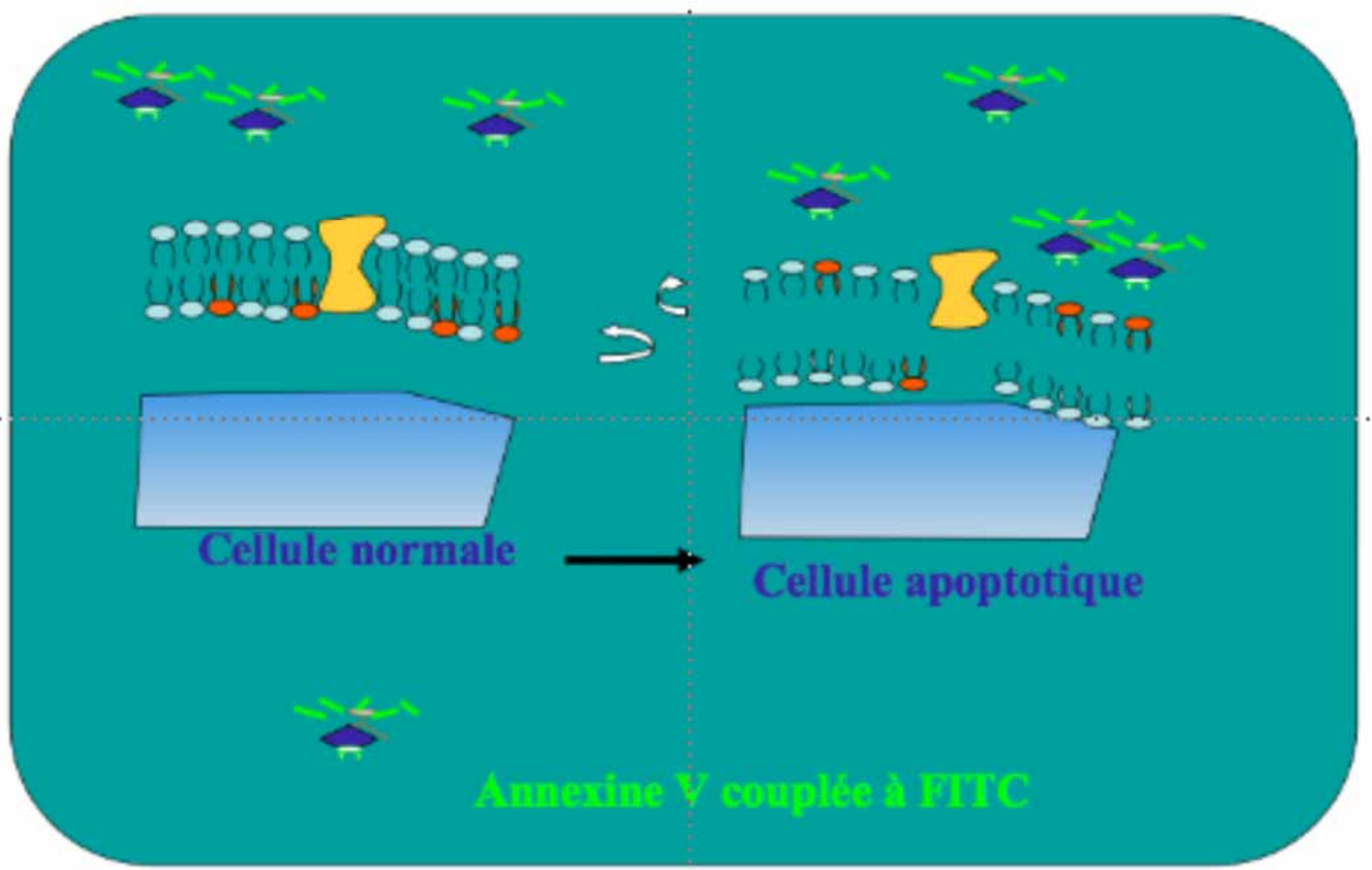
M30 CytoDEATH

Human colon, natural occurring apoptosis, M30 Biotin, AEC Technique, counterstained with Hematoxylin



Certaines caspases activent d'autres caspases et s'autoactivent : Cascade d'activation protéolytique

Détection des Phosphatidyl-Sérines par l'ANNEXINE V



	Cellules normales	Cellules apoptotiques	Cellules nécrotiques
Annexine	-	+	+
Iodure propidium	-	-	+

Cell Membrane Alterations

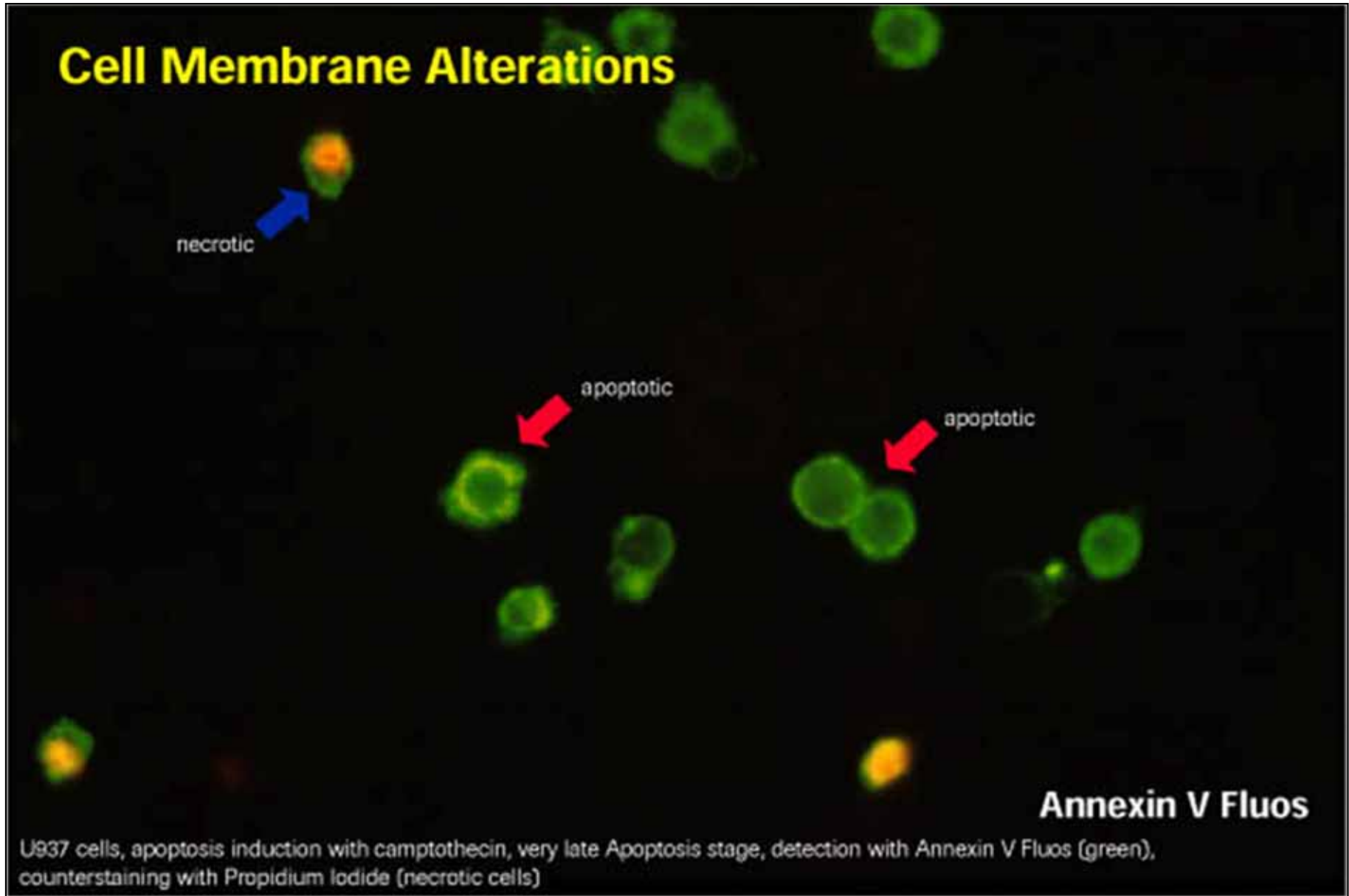
necrotic

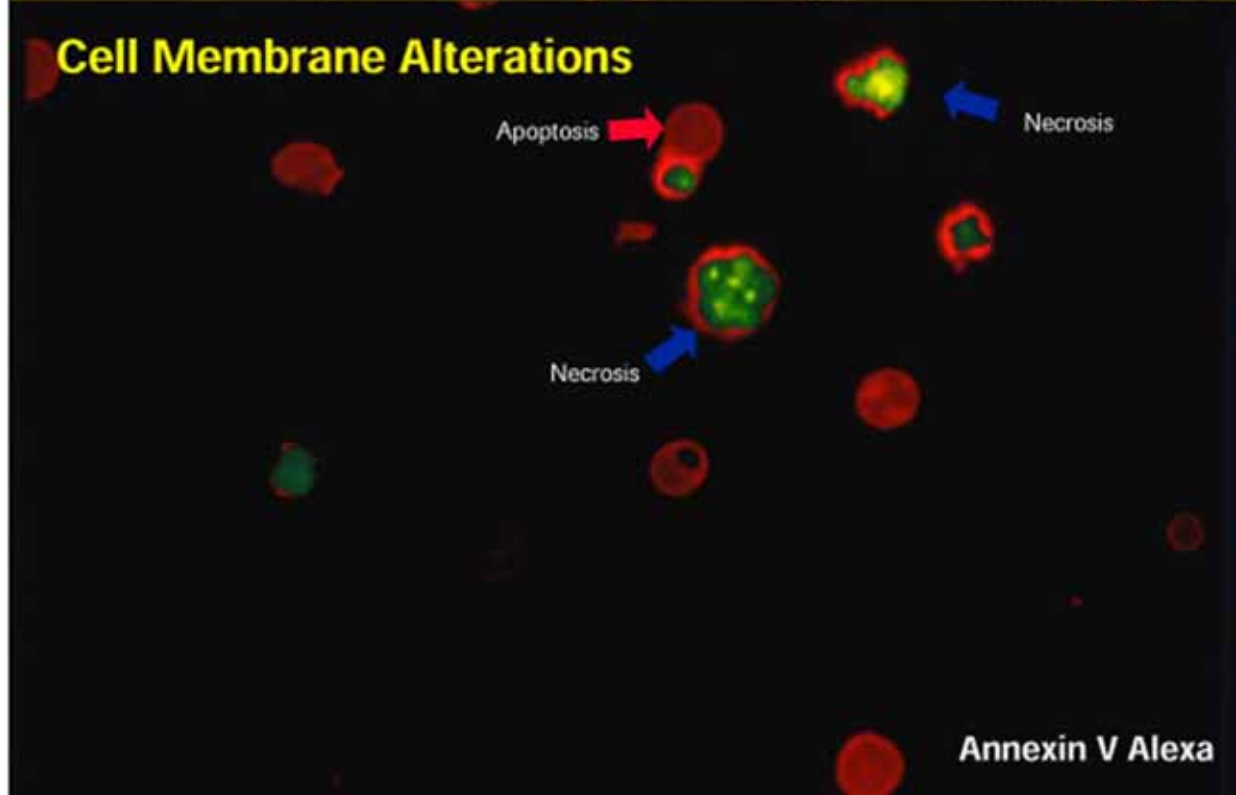
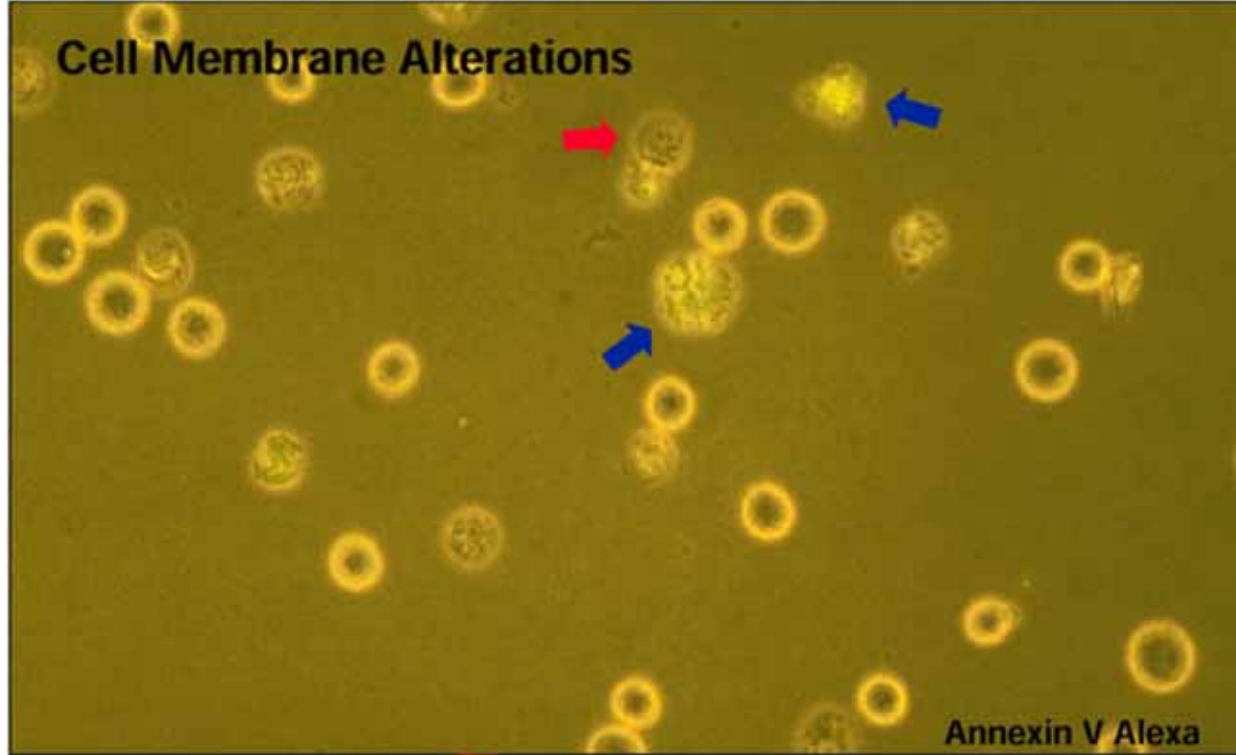
apoptotic

apoptotic

Annexin V Fluos

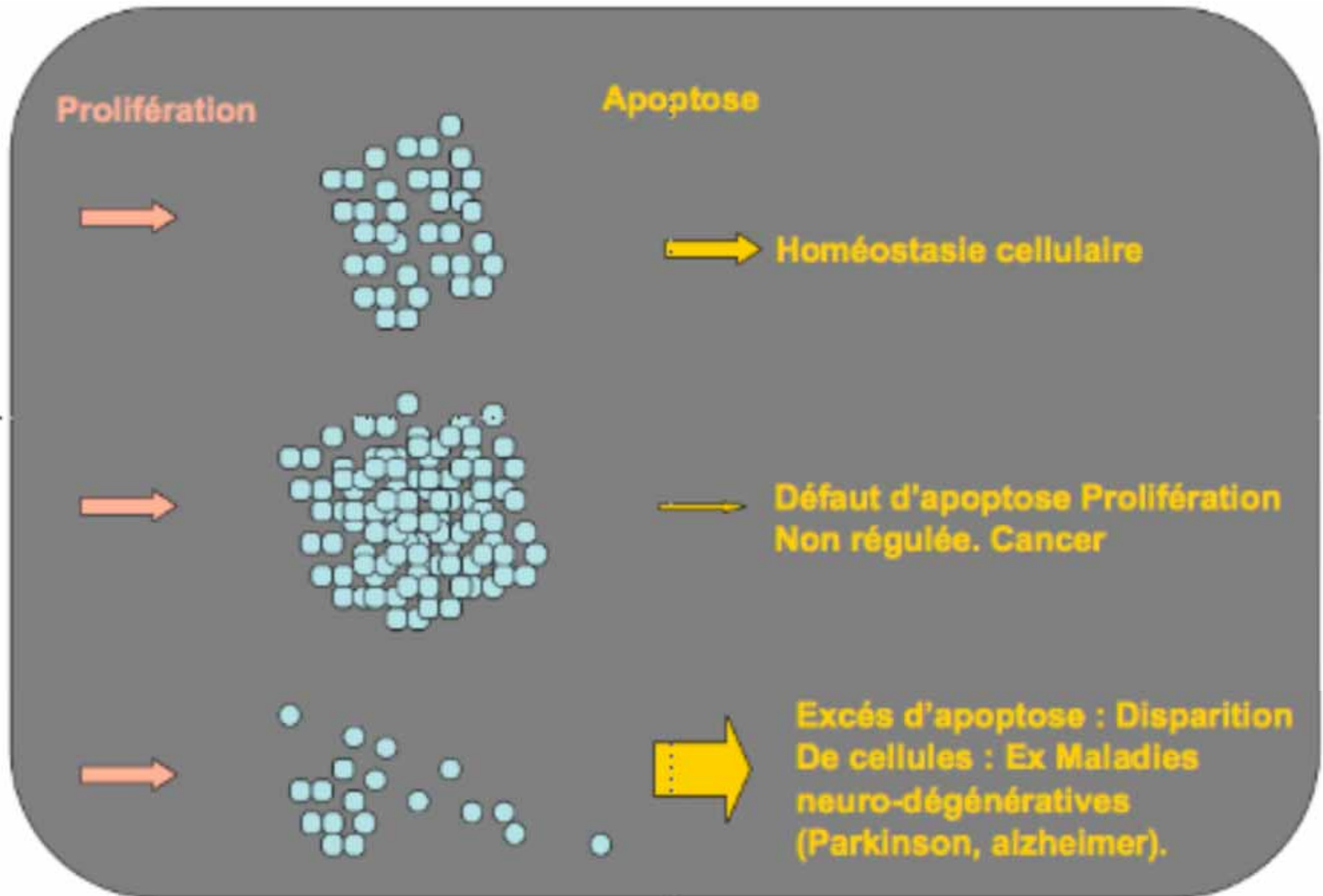
U937 cells, apoptosis induction with camptothecin, very late Apoptosis stage, detection with Annexin V Fluos (green), counterstaining with Propidium Iodide (necrotic cells)





U937 cells, apoptosis induction with camptothecin, double staining Annexin V Alexa and BOBO-1 (DNA Staining)

Apoptose et pathologie



Exemples physiologiques et pathologiques

Au cours du développement

Le développement normal d'un organe s'effectue non par modelage, mais par sculpture : les cellules sont produites en grand excès puis certaines meurent, en fonction des critères particuliers requis.

A l'âge adulte

Dans le tissu normal, il existe un équilibre entre mitose et apoptose. Les cellules nécessitent en permanence certains 'facteurs de croissance' pour survivre.

Dans le système immunitaire, l'apoptose est responsable de la déletion des cellules T auto-réactives (permettant la tolérance du soi), et la sélection des B lymphocytes responsables de la réponse immunitaire

Dans les cancers

On peut trouver des foyers d'apoptose après irradiation, chimiothérapie, la suppression hormonale (cancer de la prostate) ou au contraire la surcharge en corticoïdes (leucémies et lymphomes). Les lymphocytes cytotoxiques sont tueurs par induction de l'apoptose de la cellule cible.

Autres pathologie

A l'inverse du cancer où l'apoptose est réprimée, d'autres maladies, notamment les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson, mais aussi certaines thyroïdites, les maladies auto-immunes ou encore l'hépatite fulminante pourraient être en rapport avec une apoptose mal contrôlée.

L'utilisation de substances inhibitrices des caspases pourrait jouer un rôle thérapeutique intéressant.

Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'université Joseph Fourier de Grenoble.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits en 1^{ère} année de Médecine ou de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.