

COURS 04 - L'APOPTOSE

Essentiellement deux modes de mort cellulaire

- **La necrose** passive ou accidentelle
Survient suite à des dommages (aux membranes ou activités biologiques) concerne un groupe de cellules occasionne des effets sur l'organisme.
Occasionne l'inflammation du tissu: réaction inflammatoire impliquant notamment les facteurs de signalisation cellulaire: cytokines
- **L'apoptose:** est un processus touchant individuellement les cellules qui sont éventuellement entourées de voisins parfaitement viables
L'apoptose s'accompagne de transformations morphologique spectaculaire modifiant la forme et l'organisation des structures cellulaires puis à sa dissociation en vésicules entourée de membrane qui sont phagocytées par des cellules environnantes (essentiellement les macrophages) (corpuscules apoptotique)
L'apoptose ne produit pas de réaction inflammatoire, nécessite l'utilisation d'ATP et fréquemment la synthèse et l'activation de protéines.
Volume diminuée, et compaction des compartiment de la cellule.

Il existe trois phases:

- **Une phase d'induction** par signaux extra ou intracellulaire (initié par une **période silencieuse**)
- Une **phase effectrice** comprenant un **point de non-retour**
- Une phase très rapide et morphologiquement visible, **phase de dégradation** et phagocytose par la cellule voisine

L'apoptose est un événement très fréquent, très fréquemment méconnu.

- Au cours du **développement embryonnaire**: cellules interdigitales, cellules nerveuses, cristallin...
- Au cours du développement et de la **vie des organes**: hépatocytes, glandes mammaires, thymocytes, cellules lymphoïde...
- **Élimination** de cellules **endommagées** (irradiation, agent anti tumoraux...)

Actuellement, les corps apoptotiques phagocytés sont identifiés dans les macrophages (présence d'extrémités de DS d'ADN). Les cellules en apoptose sont reconnues par les cellules voisines. Certaines irradiations peuvent entraîner une apoptose.

L'apoptose représente donc une forme de suicide cellulaire actif (mort cellulaire programmée)

- Changement structuraux de l'apoptose
- Induction de l'apoptose par des extraits cellulaires agent externe (virus, depression en facteurs de croissance, hormones, anti tumoraux) ou modification de mécanismes cellulaires
- Activation de processus biochimiques
- Régulation de l'apoptose.

1. Changements structuraux de l'apoptose: Évènement morphologique tardifs

Après un stimulus externe, une suite d'évènements rapides

- Perte de contact avec les cellules voisines et s'arrondit
- Le REG se dilate et les vésicules sphériques fusionnent avec la membrane externe.
- En même temps que la diminution du volume cellulaire apparemment due à l'exportation d'eau et d'ions entraînant une augmentation de la densité cellulaire.

A l'intérieur d'un tissu, là où les cellules entrant en apoptose s'individualisent s'arrondissent et sont rapidement phagocytées en donnant pas lieu à une réaction de l'organisme.

- **Condensation** du noyau et de la chromatine qui se localise la périphérie du noyau formant des granules denses en contact avec la membrane nucléaire interne
- Les **centres fibrillaires nucléolaires** se **dissolvent**
- **Apparition** rapide de **bulles** sur la surface cellulaire
- A ce moment, le **noyau** se **fragmente** en morceaux entourés de membrane
- La cellule elle même se retrouve dans de nombreux sous ensembles ou **corps apoptotiques** dont certains contiennent des fragments nucléaire. Ils seront phagocyté et absorbé par les cellules voisines.

COURS 04 - L'APOPTOSE

Il n'y a **pas de relachement** dan l'espace extra-cellulaire de matériel cytoplasmique ou nucléaire: **pas de réaction inflammatoire.**

Au contraire, dans la necrose, la cellule est « passive », la lyse cellulaire relache le contenu cellulaire dans l'espace extra cellulaire entrainant l'inflammation associée la rupture de l'architecture tissulaire

L'apoptose touche des cellules isolées et préserve l'architecture tissulaire à l'exception des remodelage embryonnaire.

a. Le cytoplasme

- **Augmentation** brutale de la **densité** cellulaire (eau et ions), et donc diminution du volume cytoplasmique
- Forme et taille changent: réaorganisation du cytosquelette vesicules de **l'ergastoplasme gonflent.**
- Activité **RNasique** tardive
- **Protéolyse**

b. Le noyau

- La **membrane** nucléaire est **maintenue**
- la **lamina nucléaire** est dissociée **dépolymérisation** puis protéolysée: **laminine**
- **Liaison** à **l'ubiquitine** de protéines nucléaires dégradation par les **protéasomes**
- **Coupure** de **l'ADN** inter nucléosomiques: fragments de 50-300 Kpb (domaines chromatiniens)
- Production ultérieure de **fragment multiples** de **200pb** méthode de marquage des extrémités ainsi générées.
Les activités Dnasique précèdent les activités qui détruisent les histones.

c. Modification de surface

- **Reconnaissance** rapide par les **cellules voisines** et les **phagocytes**
- **Exposition** des chaines **polysaccharidiques** et de **PhosphatidylSerine** autrement non accessible: il y a une asymétrie entre les couches internes et externe de la membrane cytoplasmique.
- La phagocytose de celules apoptotiques n'active pas les processus inflammatoire.
- L'enveloppe cellulaire sera reconnu par les cellules voisines

2. Induction d'apoptose par des extraits cellulaire et agents externes

L'apoptose survient en réponse à différents stimuli

- **Dommages** induits sur **l'ADN** (rayons ionisant..)
- **Depression** ou eventuellement **addition d'hormone** ou facteur de **croissance**, expression déviée de gènes
- **Stimulant** ou inhibiteurs du **cycle cellulaire**, infection virale

Experiance:

- Cellules en culture présynchronisée à l'apidicoline puis synchronisées à la nacodazole (détachement).
- Les extraits protéiques cytoplsmique S/M induisent l'apoptose de noyaux interphasiques
- Après 15 minutes: rétrécissement pendant que la chromatine se condense le long de la memembrane nucléaire formant progressivement des masses isolée qui bourgeonnent à la surface nucléaires
- la membrane nucléaire persiste pendant le processus

COURS 04 - L'APOPTOSE

Donc des facteurs cytoplasmique sont responsables des remaniement structuraux des noyaux

- Les **domaines chromatiniens** condensés sont entourés de membrane nucléaire
- Les **pores nucléaires persistent**
- Très souvent les noyaux maintiennent:
 - La structure nucléolaire (structure granulaire et composante fibrillaire dense)
 - Un **réseau fibrillaire intranucléaire**
- la **lamina** se dépolymérise et est **DEGRADEE**
- Ces modification structurales sont les mêmes que décrites en présence d'apoptose

On utilise deux drogues

- **L'aphidicoline** bloque les cellule en G1/S
- Le **nocodazole** bloque la synthèse de fuseau

L'apoptose n'est pas une forme anormale de la mitose:

- Les nucléoles ne se dissocient pas aux stades précoces
- Maintent de la membrane nucléaire
- Les mottes de chromatine condensée diffèrent de la structure chromosomique (plus dense et plus homogène)

3. Activation de mécanismes biochimiques

- **Protéases** (précède la dégradation de l'ADN): **Caspases**.
Un des premier mécanisme analysé a été le clivage de la poly ADP ribosylpolymérase (reconnaissance de coupure ss). Les capases font une coupure ménagée sur une protéine, la séparant de son site actif.
Les capases sont de 10-20, synthétisées sous forme de pro-enzyme, capable d'induire des coupure à l'interieur des protéines et donc de les désactiver.
- Cette protéase est nécessaire au démarrage de l'apoptose: il existe un inhibiteur de la chlororméthycetone
- Les **protéines** de la **Lamina** (A et B) sont **coupées** par des protéases de cinétiques et caractéristiques identiques .

Les caspases ont des rôles bien identifiés:

- Ce sont des protéase **reconnaissant** l'acide **aspartique** au niveau du site de clivage, synthétisé sous forme de pro-enzyme clivée au niveau d'un aspartate, comprennent de la **cystéine** ou **serine** dans le site catalytique.
Par exemple la caspase-4 active la caspase-1 qui active la caspase-3
- Ces activité protéolytique sont sous la **dépendance** de signaux extracellulaire tels que **FAS-L** pour la caspase 3 ou **TNF alpha**
- Elles sont responsable de la **dégradation** des **protéines nucléaire** des modification du cytosquelette (**actine par la caspase 1**), de la dégradation de nombreuse kinases.
- Ces protéases sont **inhibées** par les peptides **TLCK** et **TPCK, TAME** inhibiteurs des protéases à sérine et cystéine
- Après une première hydrolyse les substrat sont dégradées plus avant
- La **surexpression** de ces protéases **provoque l'apoptose**, les **ARN antisens inhibant la synthèse** des **caspases arrêtent l'apoptose**.
- Des **protéines virales** (p35 du virus de variole) **inhibent** l'activité de plusieurs protéases
- Des **sérines protéase** de lymphocytes (granzymeB) **hydrolysent** et **activent** les caspases.

4. Dnases

L'activité Dnasique suit l'activation des caspases et est concomitant avec l'augmentation de la concentration en Ca⁺⁺. La coupure de l'ADN peut prendre plusieurs voies:

- La **coupure de l'ADN internucléosomique**
- Production de **grand fragments** (adénocarcinome colique, thymocytes)
- Coupure simple brin (en présence d'inhibiteur de topo II)

Cette activité est induite par de nombreux facteurs

COURS 04 - L'APOPTOSE

5. Modification de la surface de la cellule

Les cellules en apoptose sont rarement observées sous forme « libre », la phagocytose est réalisée par les macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales et de l'endothélium veineux.

Il y a perte de l'asymétrie de la composition en phospholipides de la membrane cellulaire (diminution d'activité), cette perte d'activité est liée à l'activité des caspases. La phosphatidylserine est un ligand directement ou par l'interaction avec des protéines, de récepteurs (scavenger).

Il existe des motifs protéiques (AGA) qui également bloquent la phagocytose. Des lipopolysaccharide et formes oxydée ou acétylé de lipoprotéine sont également reconnus.

Voie privée c'est à dire: dépendant des signaux
Exemple:

- Dans le développement embryonnaire ced-3 ou caspase-3 protéase à sérine activée
- Récepteur Fas en interaction mobilise caspase-1 ou enzyme convertisseur de l'interleukine-1
- Famille multigénique bcl-2

6. Le système FAS induction de l'apoptose de lymphocytes ou d'hépatocytes

- FAS est une protéine essentiellement membranaire de la famille des récepteurs TNF présente à la surface de nombreuses cellules
- **FAS-ligand** est une protéine de la famille des **TNF** localisé à la surface des **lymphocyte-T**
- Il est possible d'induire l'apoptose d'hépatocyte par injection intra-péritonéale d'anticorps anti-Fas quatre heures après injection.
 - Induction massive de l'apoptose
 - Anomalie des mitochondries en période pré-apoptotique et apoptotique rupture de la membrane externe et sortie de matériel dans le cytosol.
- Apoptose induite par FasL
 - Transmission du signal formation d'un complexe cytoplasmique conduisant à l'activation de la **procaspase 8**
 - Activation de **deux voies**
 - **mitochondrie (cytc-Apaf-1)** puis activation de la caspase 3
 - **activation directe** de la **caspase-3**
- **Les mitochondries prennent une forme sphérique**, disparitions des crêtes, augmentation de volume. Le milieu intermembranaire de la mitochondrie vient en contact avec le cytoplasme.

7. Rôle des mitochondries dans l'apoptose

Ces événements peuvent être mis en évidence avant et pendant les modifications morphologiques (condensation et fragmentation de l'ADN nucléaire)

- Réduction du potentiel transmembranaire et arrêt de production d'ATP.
- Libération dans le cytosol de facteurs et de cytochrome c
- Ces modifications sont inhibées par la surexpression de Bcl-2 (grande famille d'inhibiteur/activateur de mort cellulaire, proche les uns des autres)

Notion de transition de perméabilité mitochondriale. Ces facteurs vont intervenir dans la régulation de la mort cellulaire.

La mort cellulaire programmée à besoin d'activation de transcription et activation de nouvelles protéines

COURS 04 - L'APOPTOSE

- Transition de perméabilité
 - **Chute du gradient électro-chimique de protons**
 - **Chute du rapport ATP/ADP**
 - Production de **radicaux libres**
 - Forme réduite du **glutathion**
 - **Libération** du **CytC**: accroissement de concentration des électrons
 - **Accroissement** de la **concentration** en **Ca⁺⁺ cytosolique**, active les DNase sensible au Ca⁺⁺
 - Activation des protéases cytosoliques.

La protéine charnière est la caspase 3

Transition de perméabilité mitochondriale (PT) entraîne une boucle positive d'auto-amplification.

Conséquence de l'ouverture du pore

- **Chute** de la force **protomotrice**
- **Perturbation** de **biogénèse** mitochondriale
- **Rupture** du métabolisme **énergétique**
- **Découplage** de la chaîne respiratoire
- **Surproduction** d'anions **superoxyde**
- **Oxydation** du glutathion

II. Troie voie distincte d'induction d'apoptose

- **Voie extrinsèque**: Famille des **TNF** dont Fas
- **Voie perforine/granzyme**: **lymphocyte T cytotoxique**, transportant des protéases et des perforine (soluble dans l'eau, mais lorsqu'elles sont en contact avec des membranes elle se déroule mettant les parties hydrophobes se mettent en évidence)
- **Voie intrinsèque**: voie **mitochondriale**.

1. Voie Extrinsèque

Interaction transmembranaire impliquant un récepteur et la superfamille des récepteur TNF qui présentent un domaine cytoplasmique qui va oligomériser (domaine de mort de 80aa)

La dimérisation est associée à une activation autocatalytique de la caspase 8.
L'interaction ligand-récepteur va modifier les interactions protéine et activer la caspase qui va entraîner une boucle auto-catalytique qui vont à leur tour activer les caspases.

2. Voie perforine / granzyme

Les lymphocytes T cytotoxiques sont capables de tuer les cellules tumorales ou infectées par soit la voie extrinsèque (FasL) soit par sécrétion de perforine qui produisent des pores et l'écrétion de granules cytoplasmiques contenant des protéases (granzyme A et B sérine protéases):

- Granzyme B est une protéase clivant au niveau de résidus acide aspartique et active la procaspase 10.
- Granzyme B clive Bid et induit le relargage de cytochrome c, comme également active la caspase 3.
- Granzyme A active les DNases.

Ce système aboutit à l'hydrolyse de protéine et d'acide nucléique.

COURS 04 - L'APOPTOSE

3. Voie intrinsèque

Médiée par des **signaux inactivateurs** (**absence de facteurs de croissance**, hormones, cytokines) ou activateur (radiations, toxines, hyposxie, hyperthermie, infection virale, radicaux libre intra cellulaire).

Tous ces stimuli induisent des modifications e la membrane interne de la mitochondrie avec la perméabilité transitoire de la mitochondrie (MPT)

Formation de **l'apoptosome** formé du CytC, Apaf 1 et procaspase 9 qui est activé. Des endonucléase sont relachée de la mitochondrie et active dans le noyau.

- Le contrôle de la voie mitochondriale est réalisé par les membre de la famille des protéine **bcl-2**.
- Les 25 familles de protéine de la famille BCL-2 interviennent dans le contrôle de la perméabilité des membrane mitochondriale.
- Elles interviennennt dans la régulation de la libération du cytochrome.
- **Bcl-2, Bcl-XL, Bcl X sont antiapoptotique**
- **Bcl-10, Bax, Bid sont pro-apoptotique**
- Ces protéines agissent sous forme de dimères.

4. Voie finale de l'apoptose

La voie finale est commune, et mobilise les **caspases -3, -6 et -7** qui vont hydrolyser les **protéines nucléaires** et du **cytosquelette**.

La caspase 3 peut etre activée par plusieurs caspases et à son tour active des endonucléase et de protéase est necessaire à la formation de corps apoptotique (induction du clivage de l'actine)

L'externalisation de la phosphatidyl-Serine s'accompagne de la perte d'activité de l'animophospholipide translocase.

III. Conclusion

- L'apoptose est une forme de mort cellulaire diférente de la nécrose, aponecrose, autophagie (energie, synthèse de protéine).
- Elle intervient durant la morphogenèse et le développement
- Il s'agit de **mécanismes normaux** maintenant **l'homéostasie** cellulaire
- Des nombreux **inducteurs externes physiologique** ou **pathologique** ont été identifiés
- L'apoptose est diminuée ou augmentée dans de nombreuses pathologies
- Elle dépend d'un **nombre limité** de gène et de groupes de protéases.
- Lorsqu'il y a un choc sceptique, il y a un emballement de mort cellulaires