

# Physiologie des grandes fonctions

COURS PHYSIQUE MEDICALE

2023-2024

Dr: BENAZI Nabil

# Plan

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

## Historique :

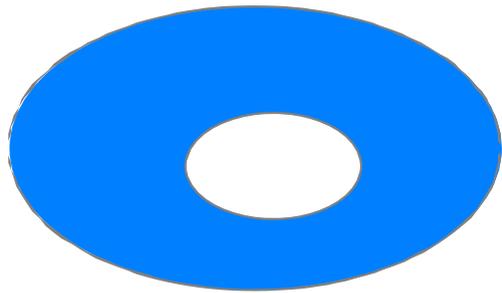
Kerr 1972

## Définition :

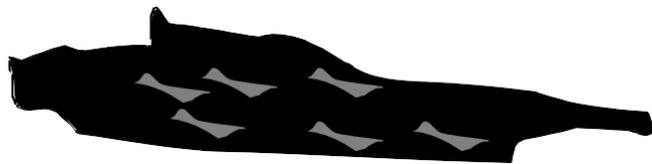
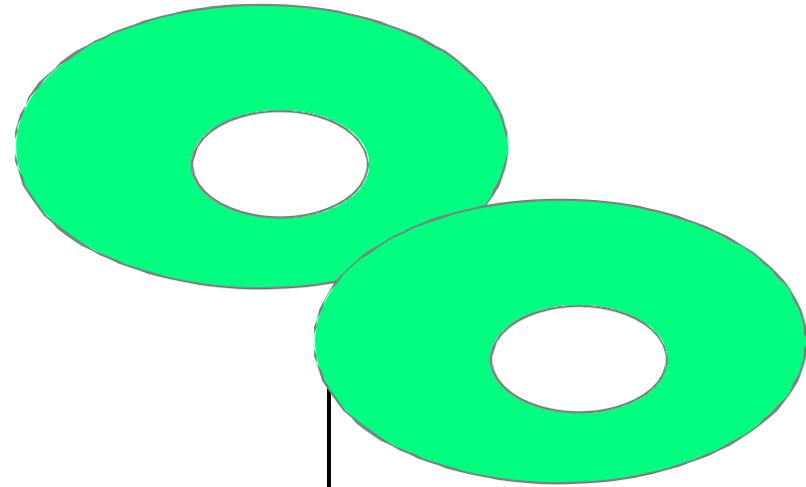
- Le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : **apo** pour éloignement, **ptose** pour chute.
- Notion de programme
- Implications majeures en physiologie et en pathologie

# Situation de l'apoptose par rapport à la physiopathologie cellulaire

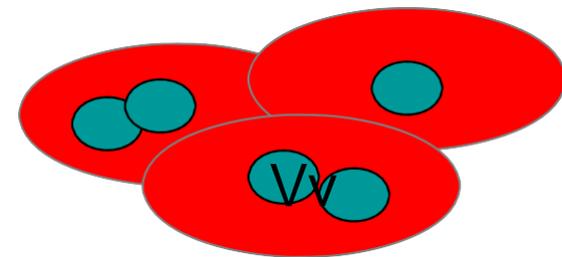
**État différencié**



**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**.

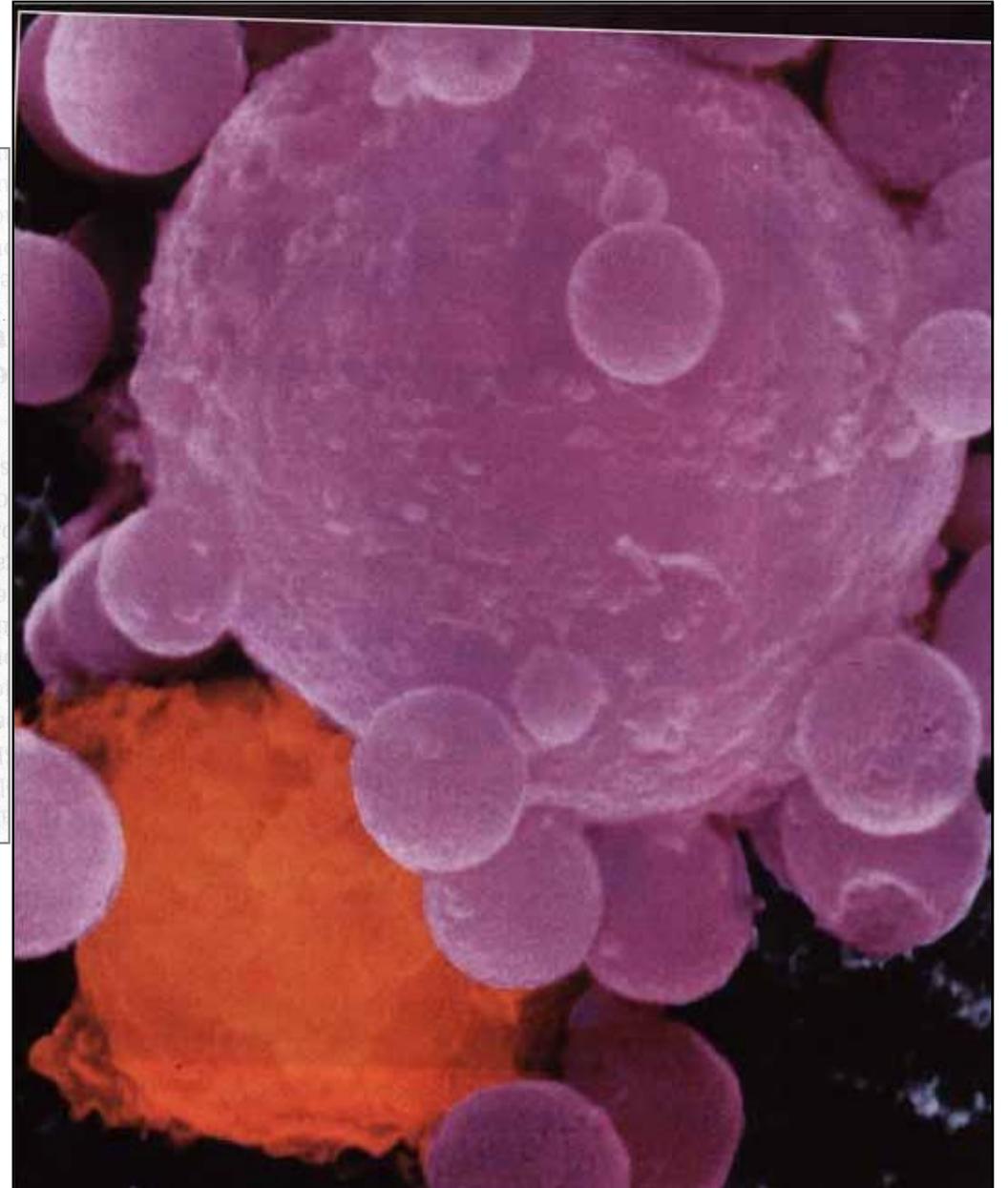
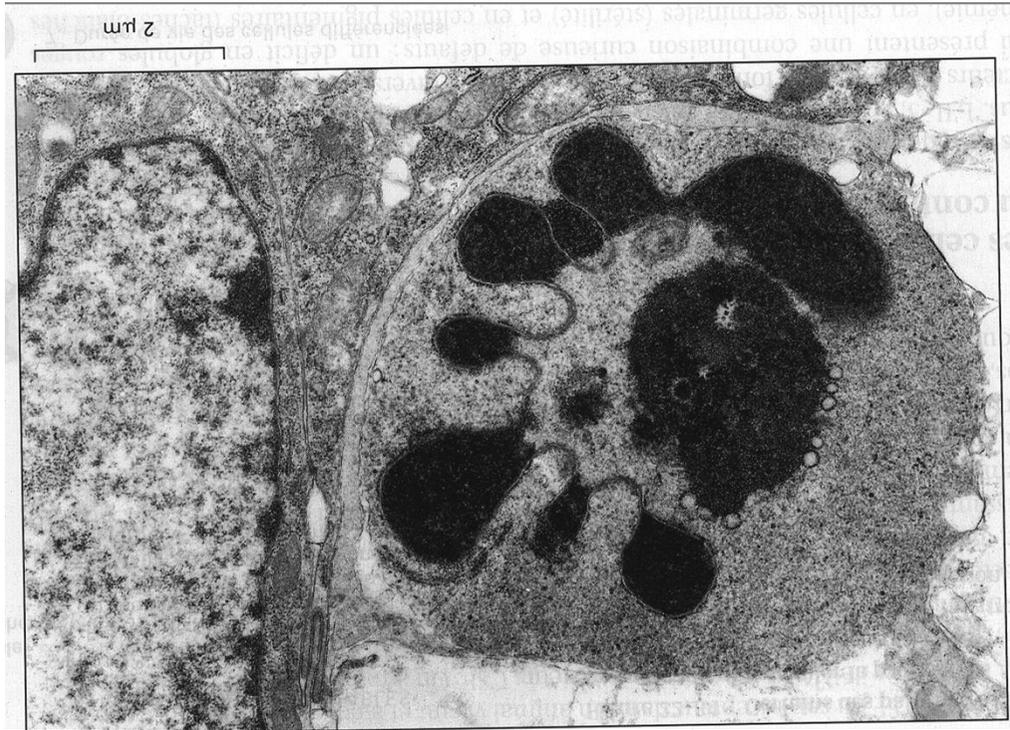
-Le noyau se fragmente ensuite, chaque fragment entouré d'une double enveloppe.

-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

	<b>Nécrose</b>	<b>apoptose</b>
<b>Causes</b>	Anoxie, dommages physiques ou chimiques	Déplétion en facteurs de croissances hormonale, lésions ADN
<b>modifications nucléaires</b>		condensation segmentation fragmentation
<b>modifications membranaires</b>	Lyse	protusion
<b>modification mitochondriales</b>	gonflement	
<b>biochimie</b>		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

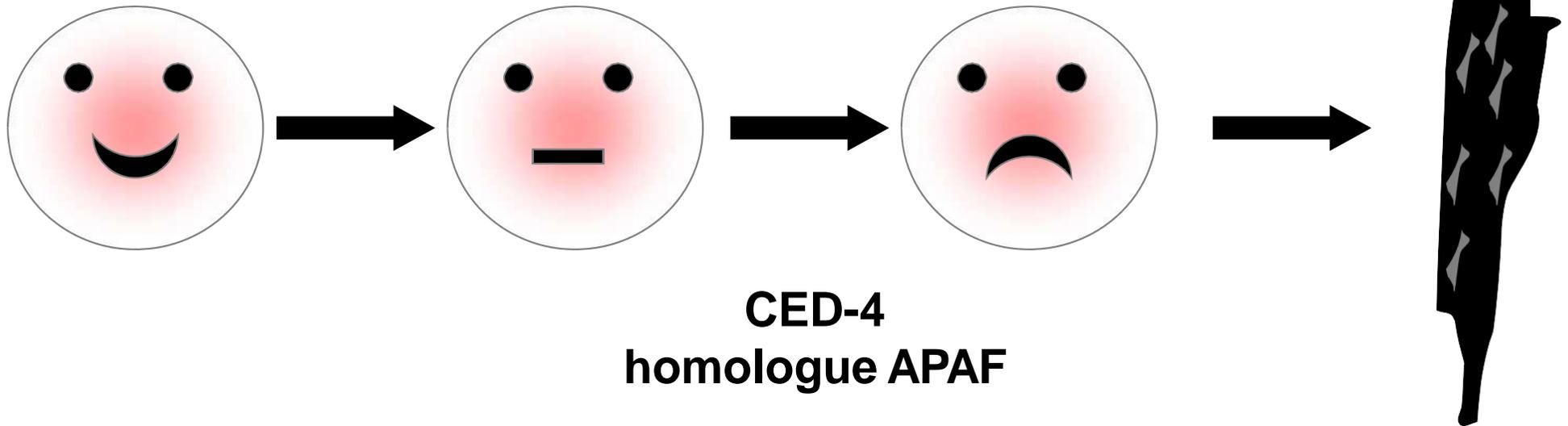
**ced-9 ---] ced-4 ---> ced-3 ---> mort cellulaire**

1090 cellules

Cellule engagée  
vers l'apoptose

En cours  
d'apoptose

Cellule  
morte  
phagocytée



CED-4  
homologue APAF

CED 9

CED 3

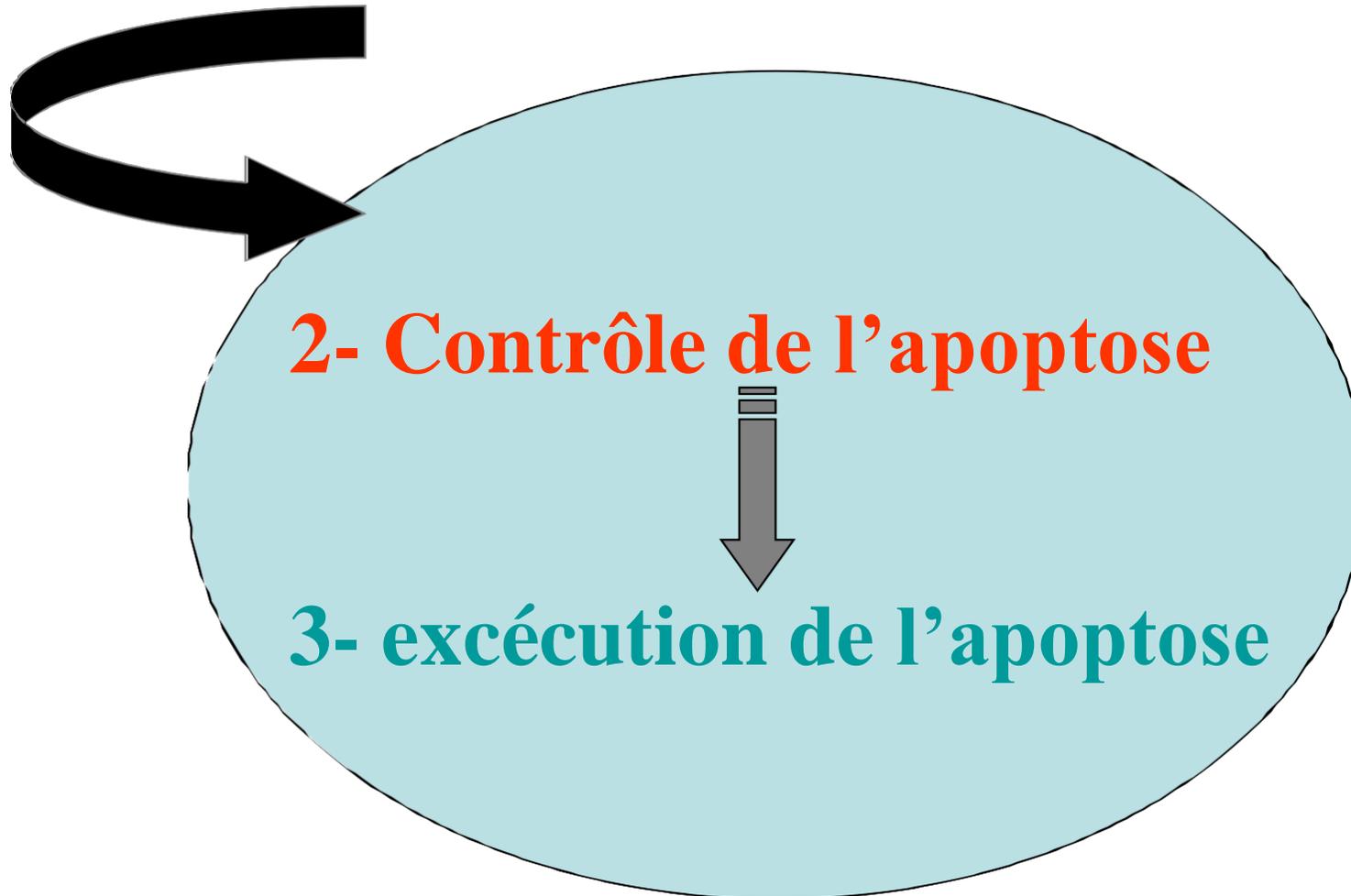
Homologue  
de Bcl-2

Homologue  
des caspases

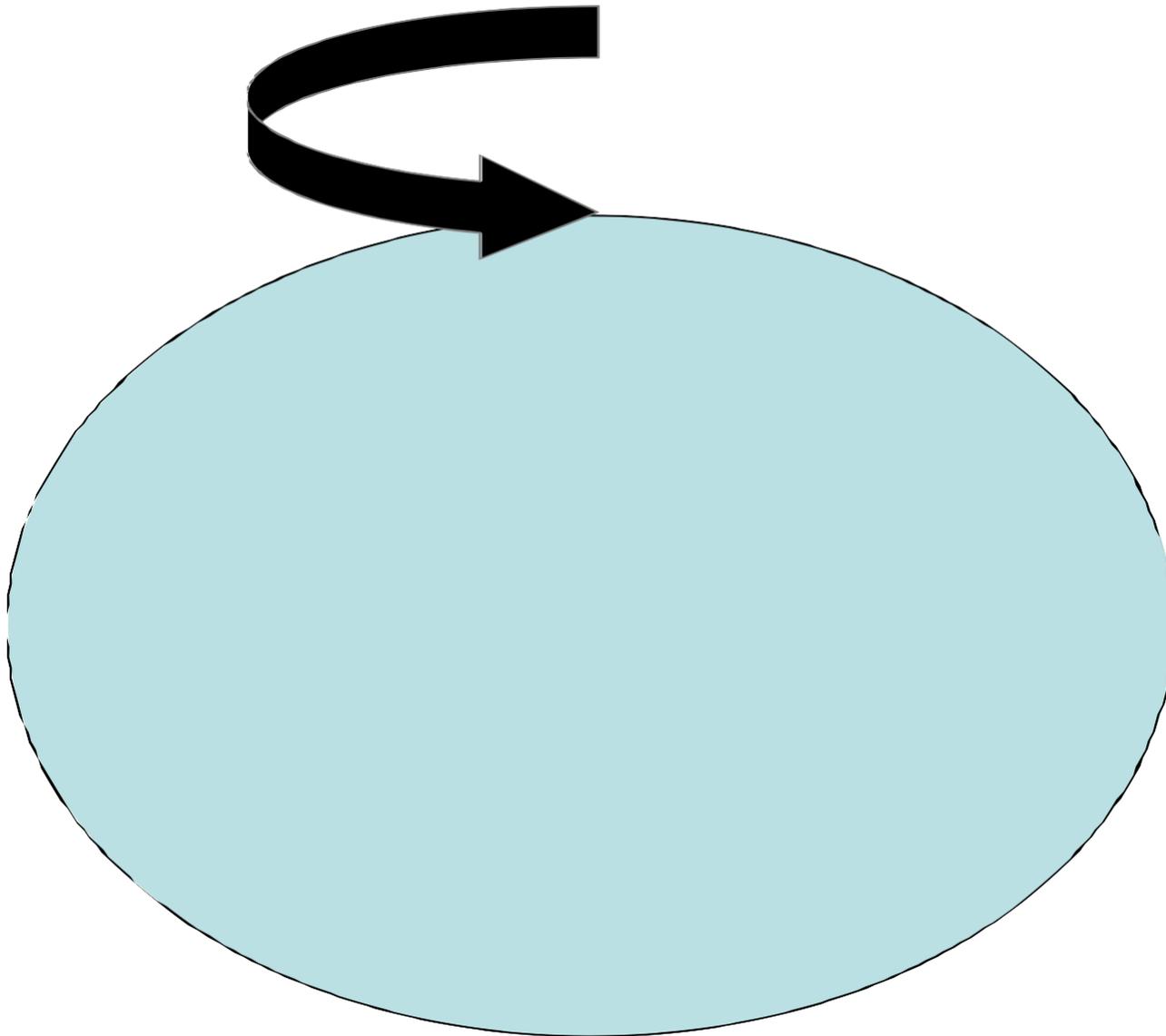
959 cellules

# Modélisation de l'apoptose

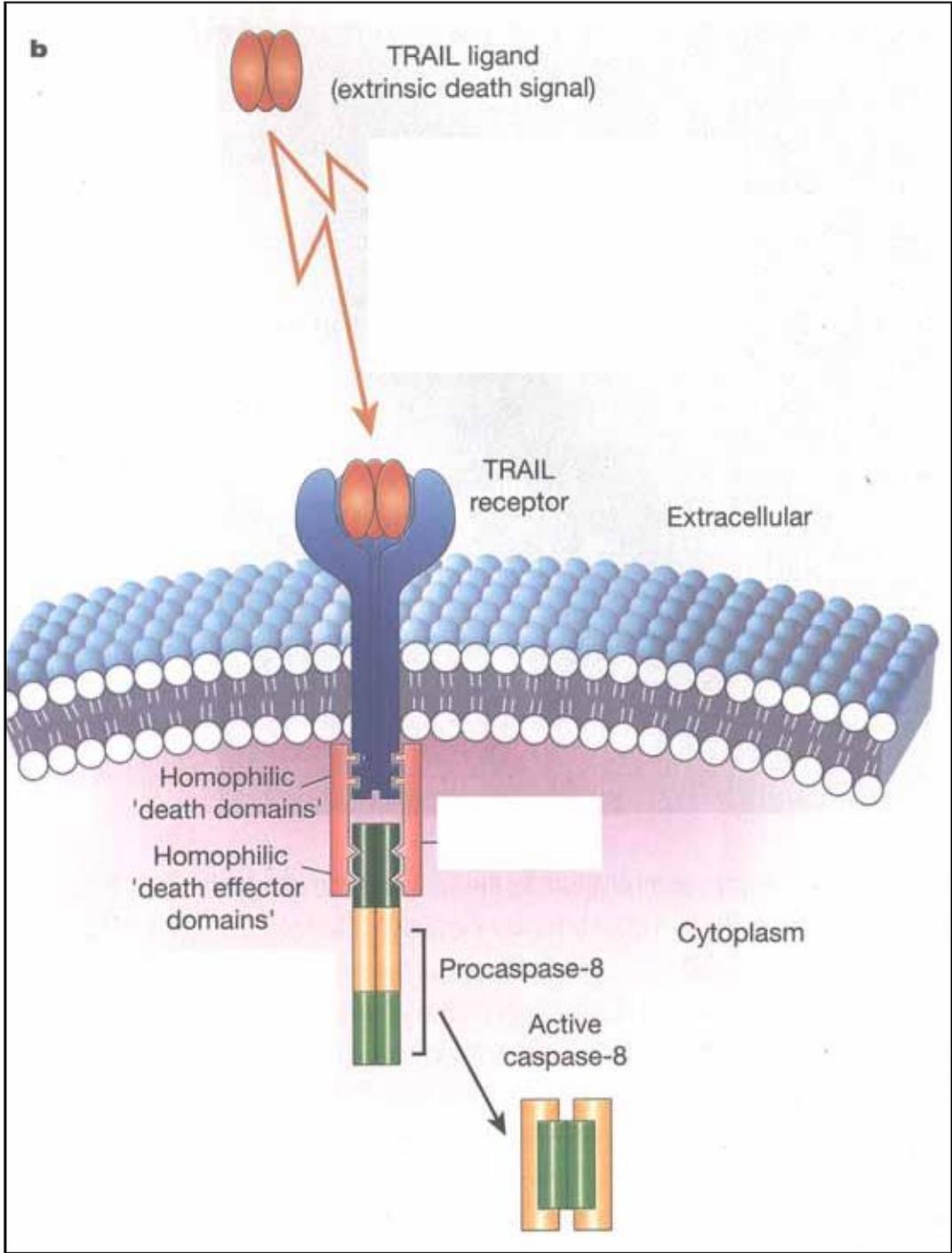
1- Signal apoptotique



# 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

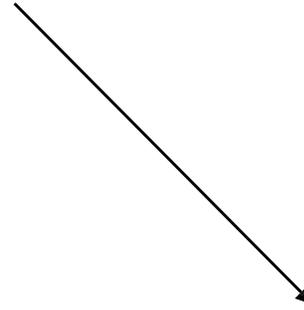
- Homologue de Ced-9
- Protéine connue depuis 1985 pour sa surexpression dans un type particulier de lymphome
- s'oppose à la mort cellulaire

# Notion de protéine pro-apoptotique

- **BAX**

**Bcl-2**

**BAX**



**État pro-apoptotique**

**Etat anti-apoptotique**



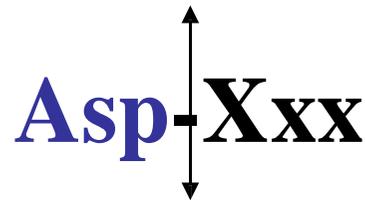
### **3** exécution de l'apoptose

- **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

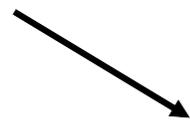


- Substrat :
  - protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire
  - Endonucléases
- La neutralisation des caspases diminue l'apoptose

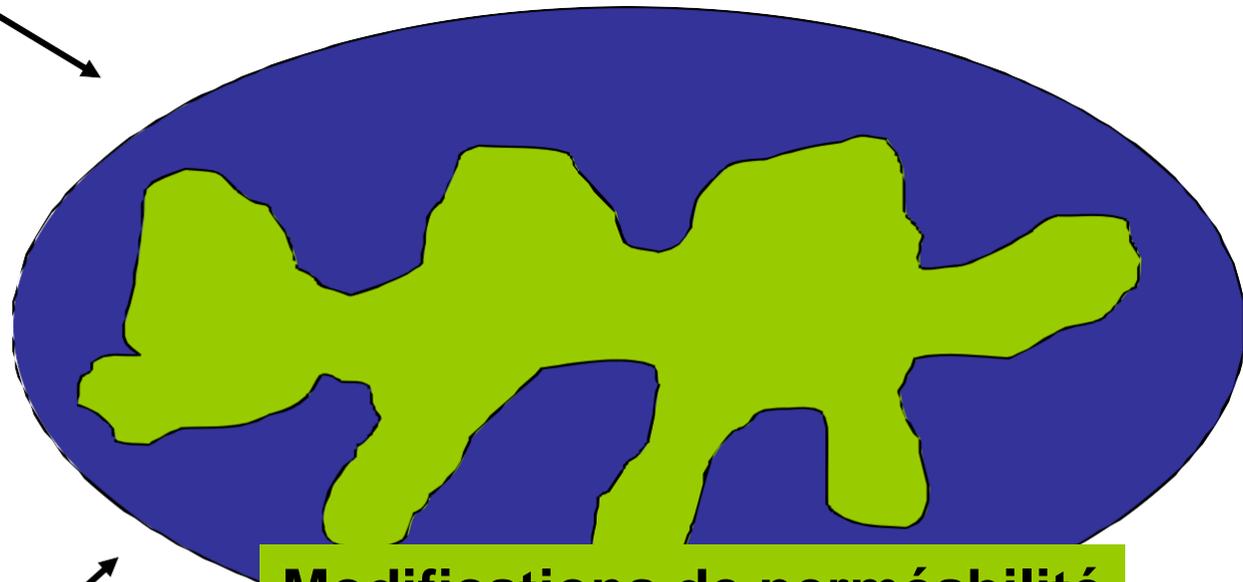
# La mitochondrie

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

**Induction de l'apoptose**

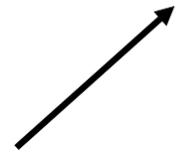


**Mitochondrie**



**Modifications de perméabilité membranaire**

**Bcl-2 / Bax**



**Cytochrome C**

**Facteur AIF  
(apoptosis inducing  
Factor)**



**Caspases**

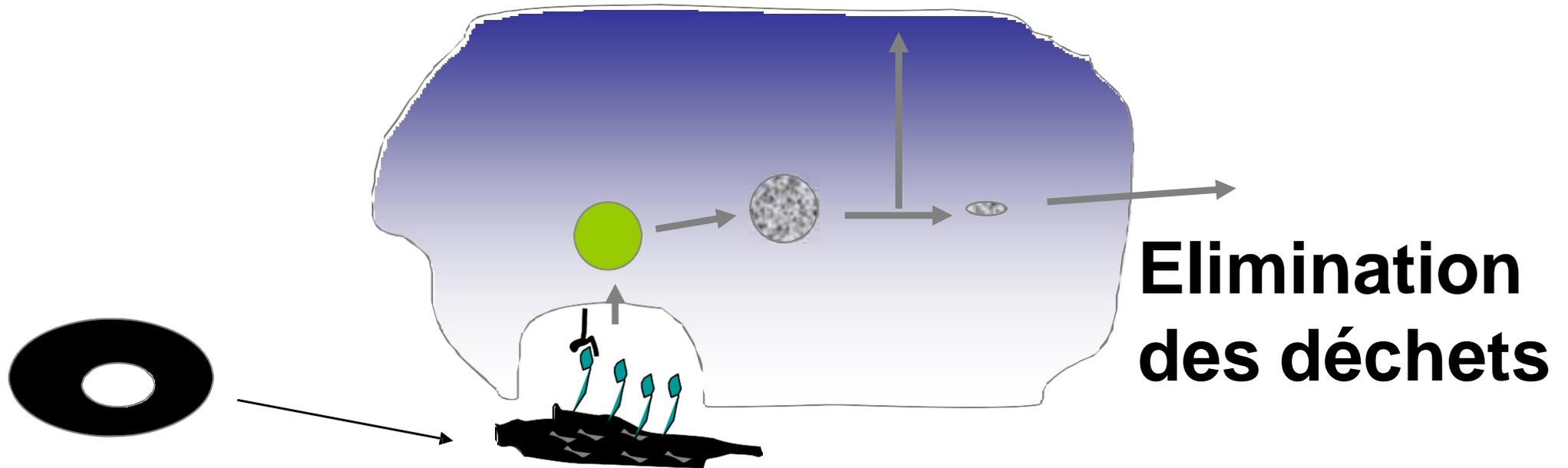


**Execution de l'apoptose**

# Élimination des cellules mortes par les macrophages

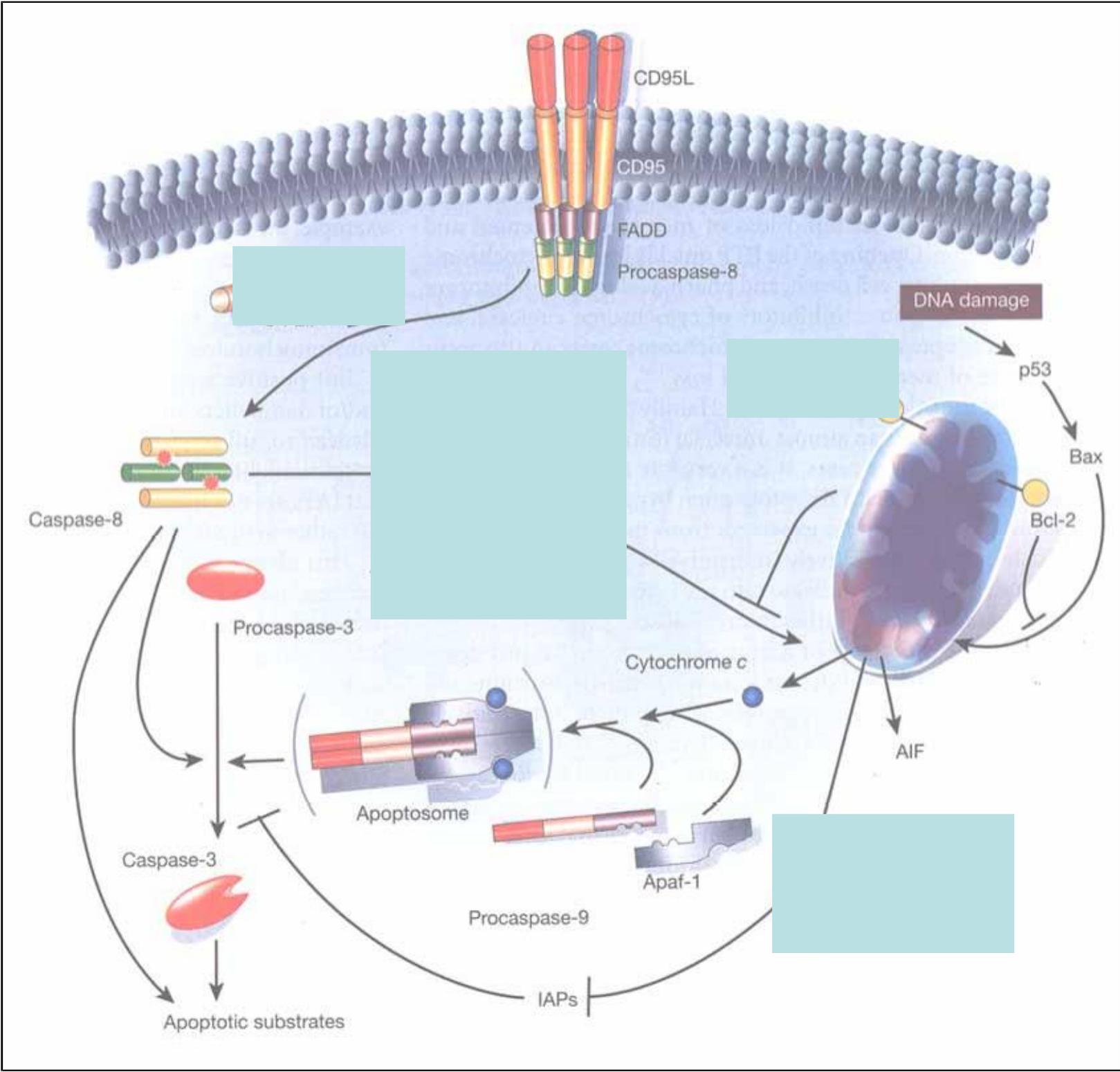
- Prévenir la toxicité des produits intracellulaires
- mécanismes de reconnaissances
- dégradation et élimination
- Suppression de l'inflammation

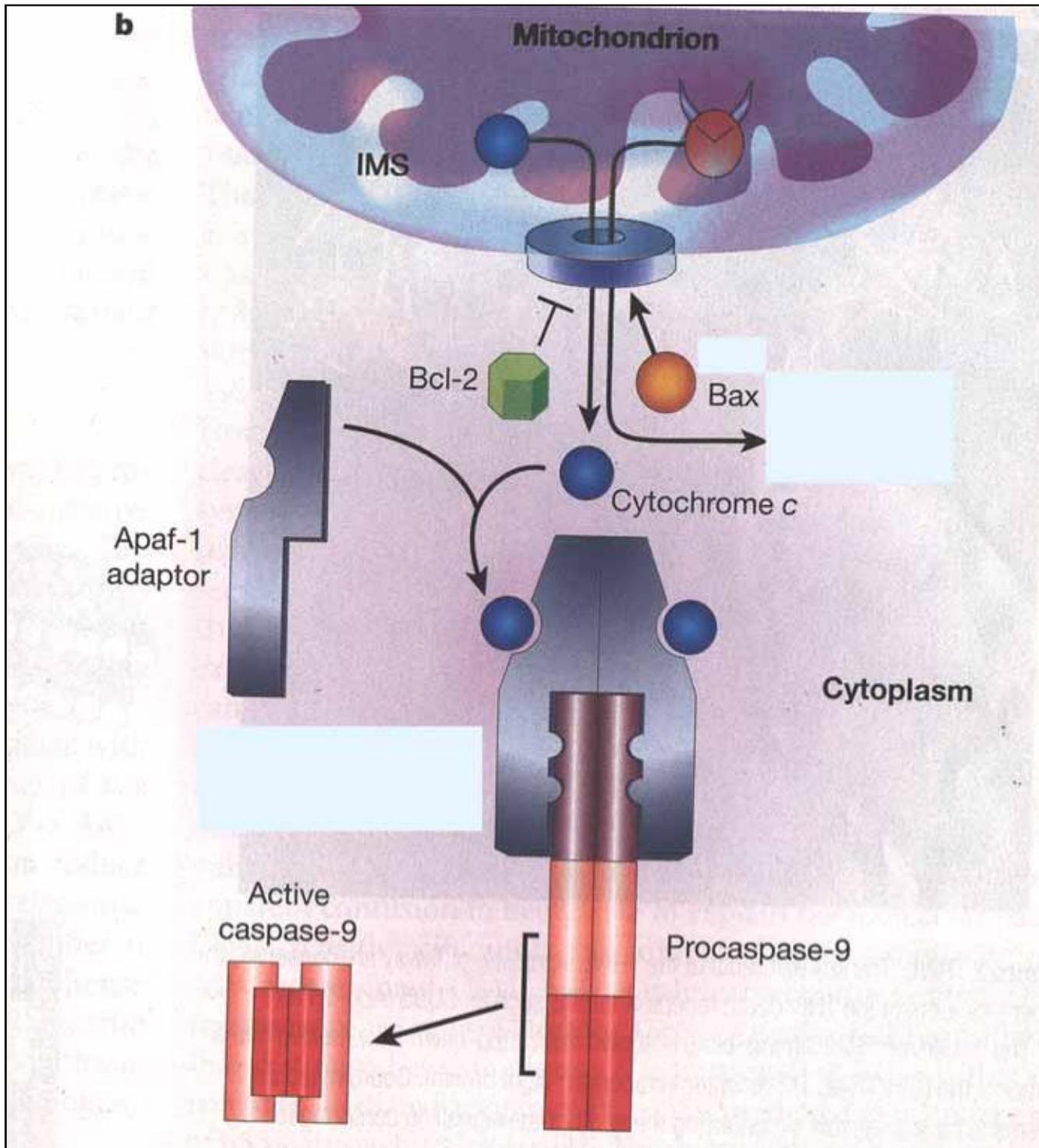
# Présentation au système immunitaire



« 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

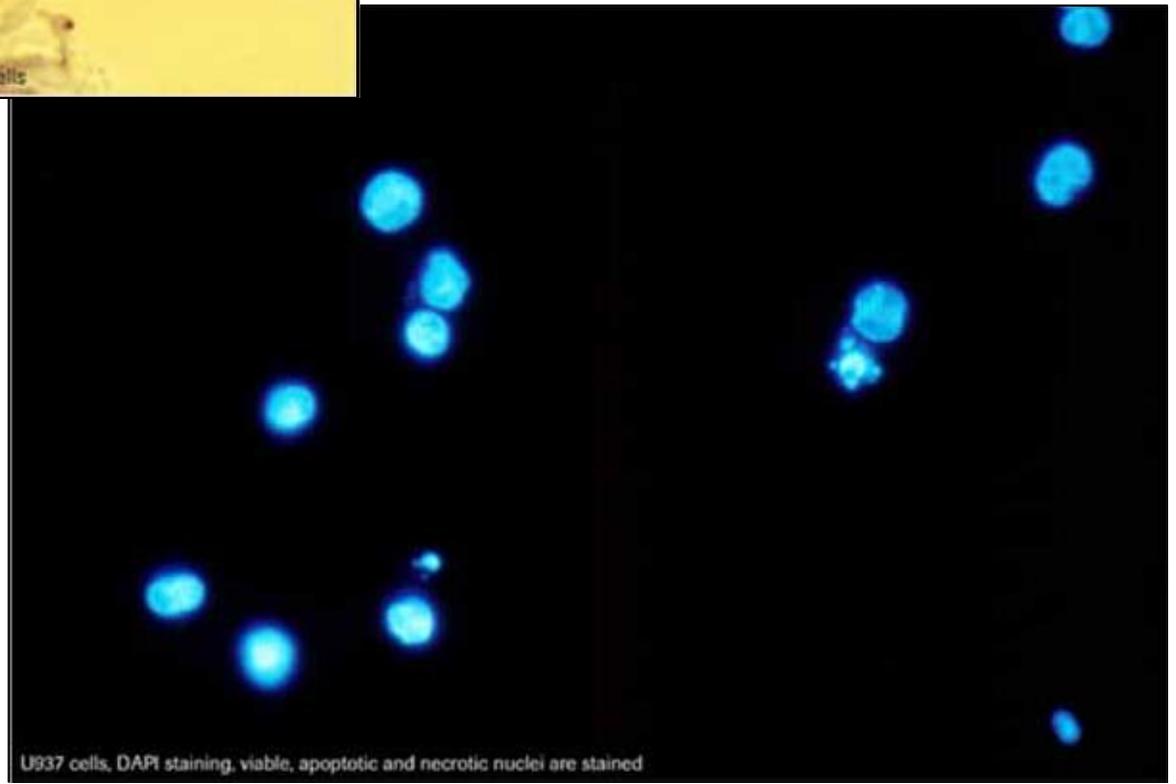
# Techniques d'étude de l'apoptose

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

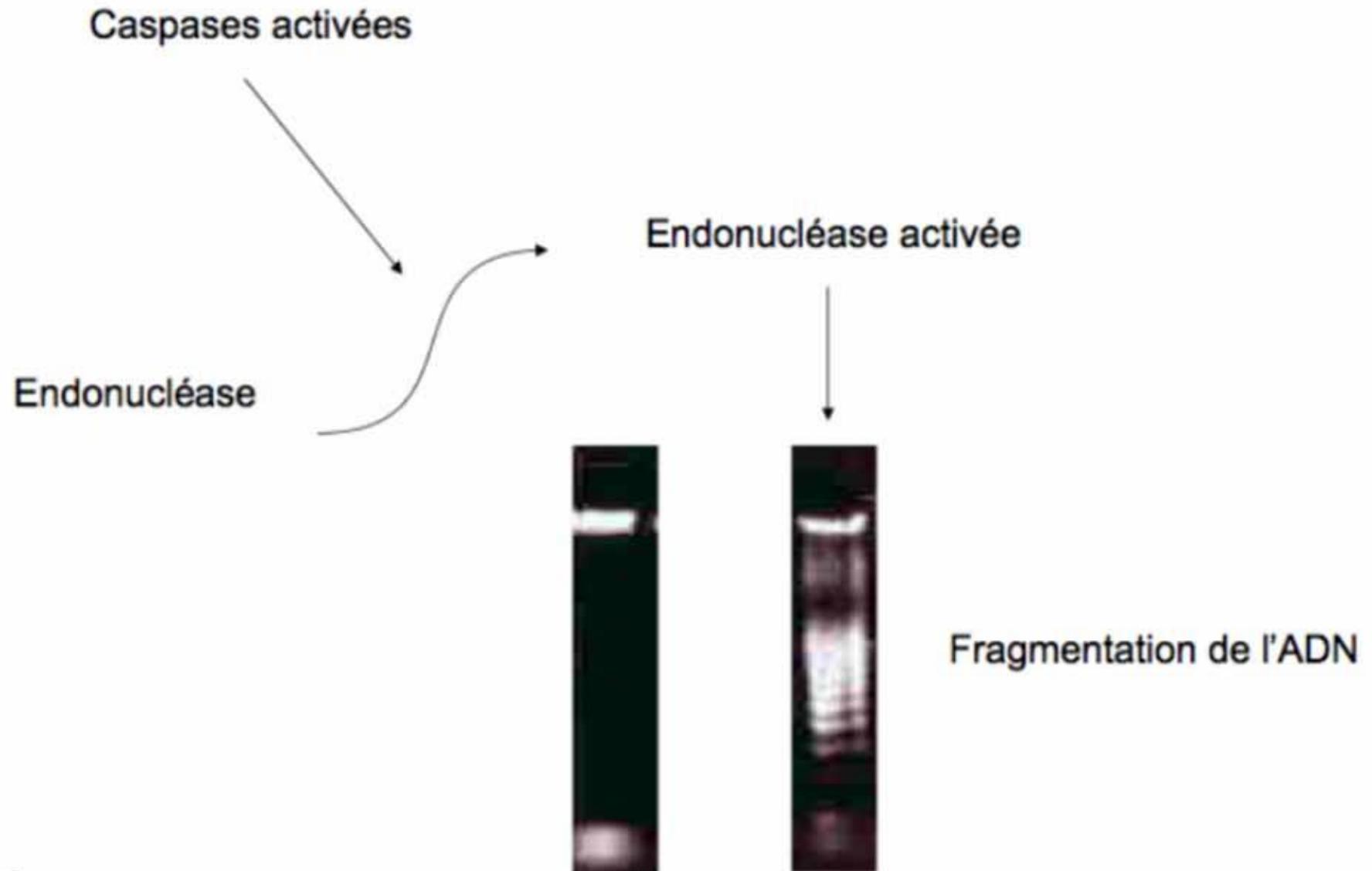
# Morphologie



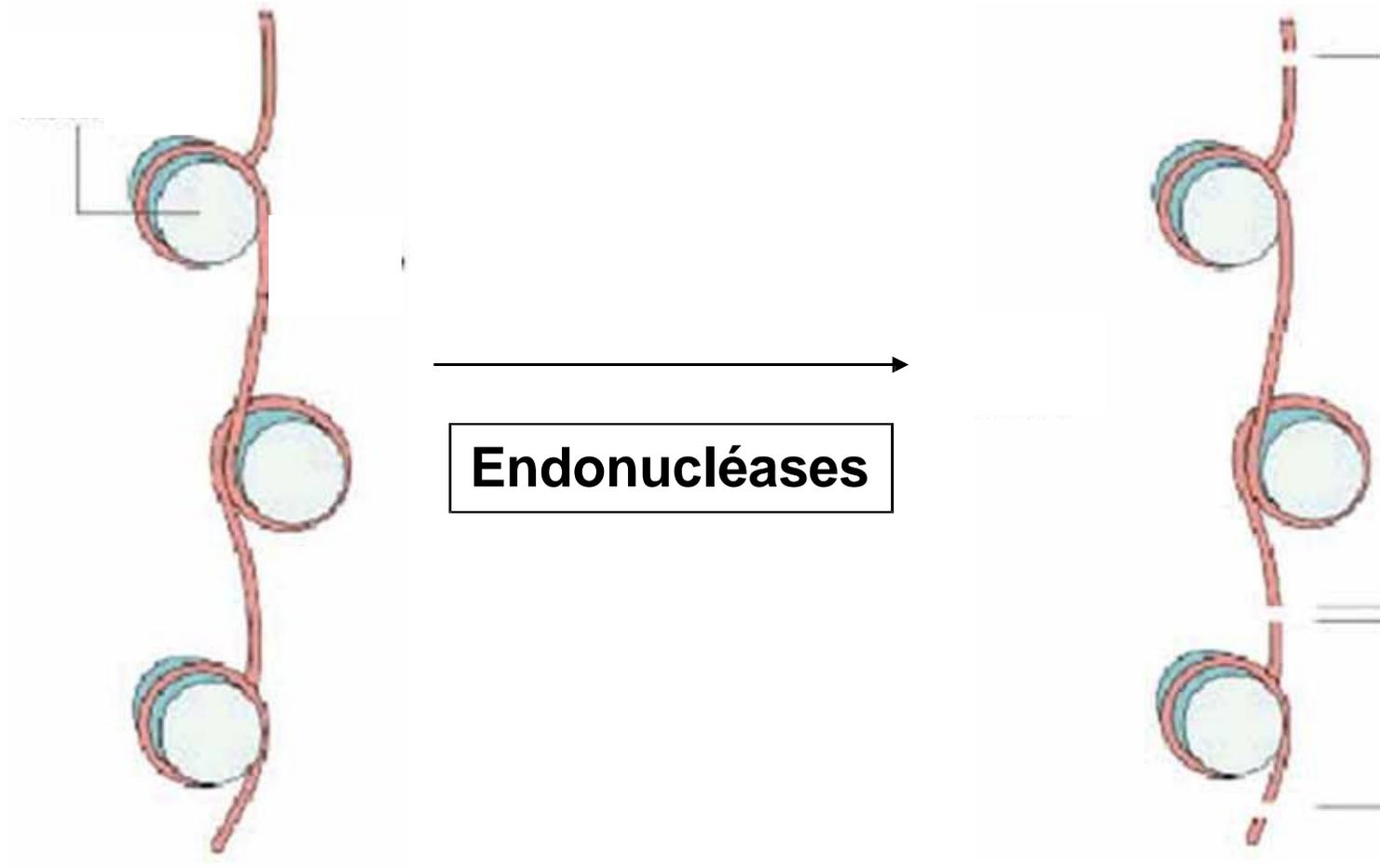
# Coloration nucléaire



# Activation des endonucléases



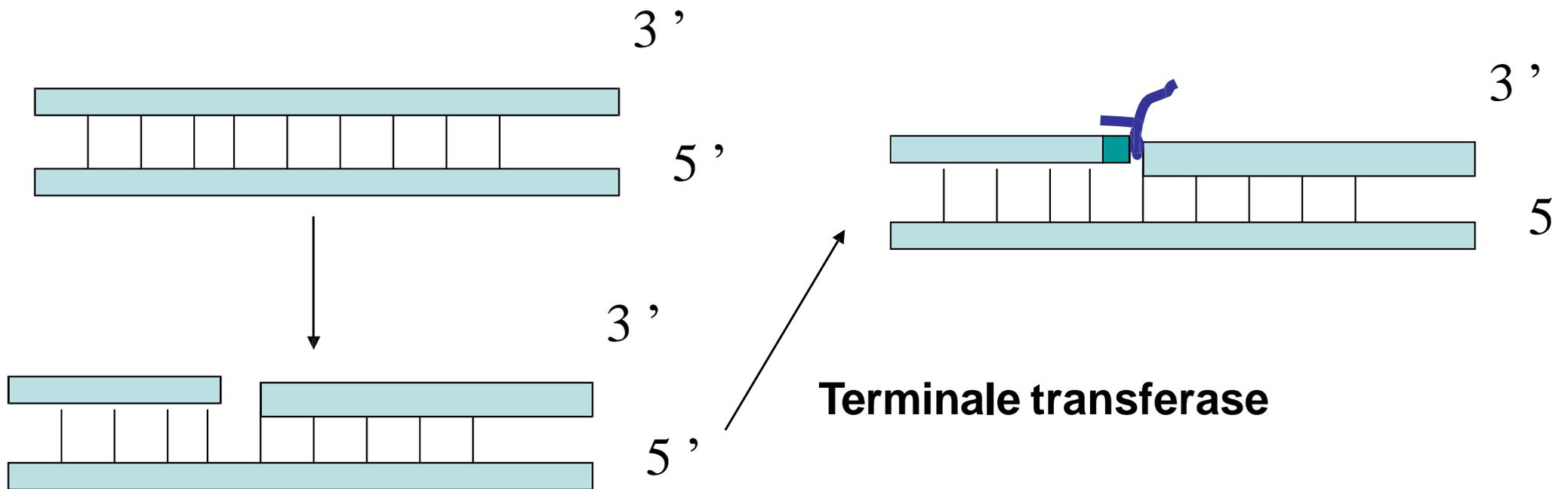
# Fragmentation de l'ADN

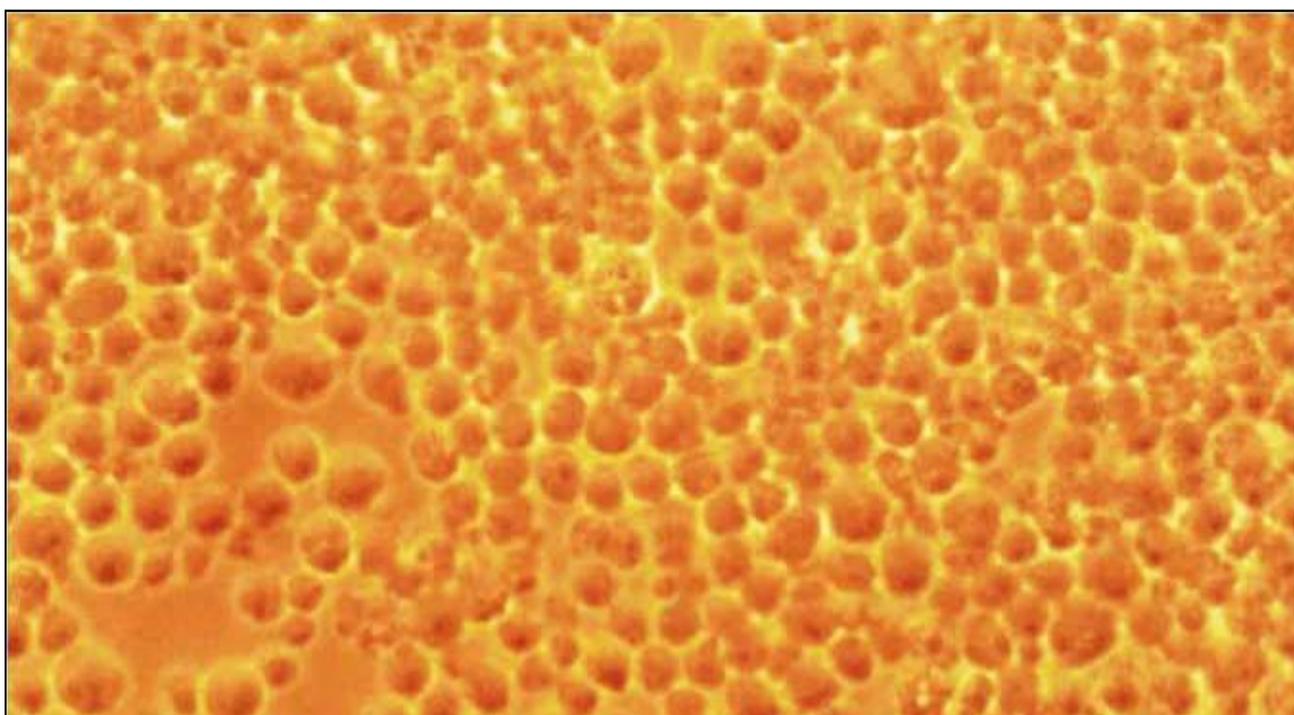




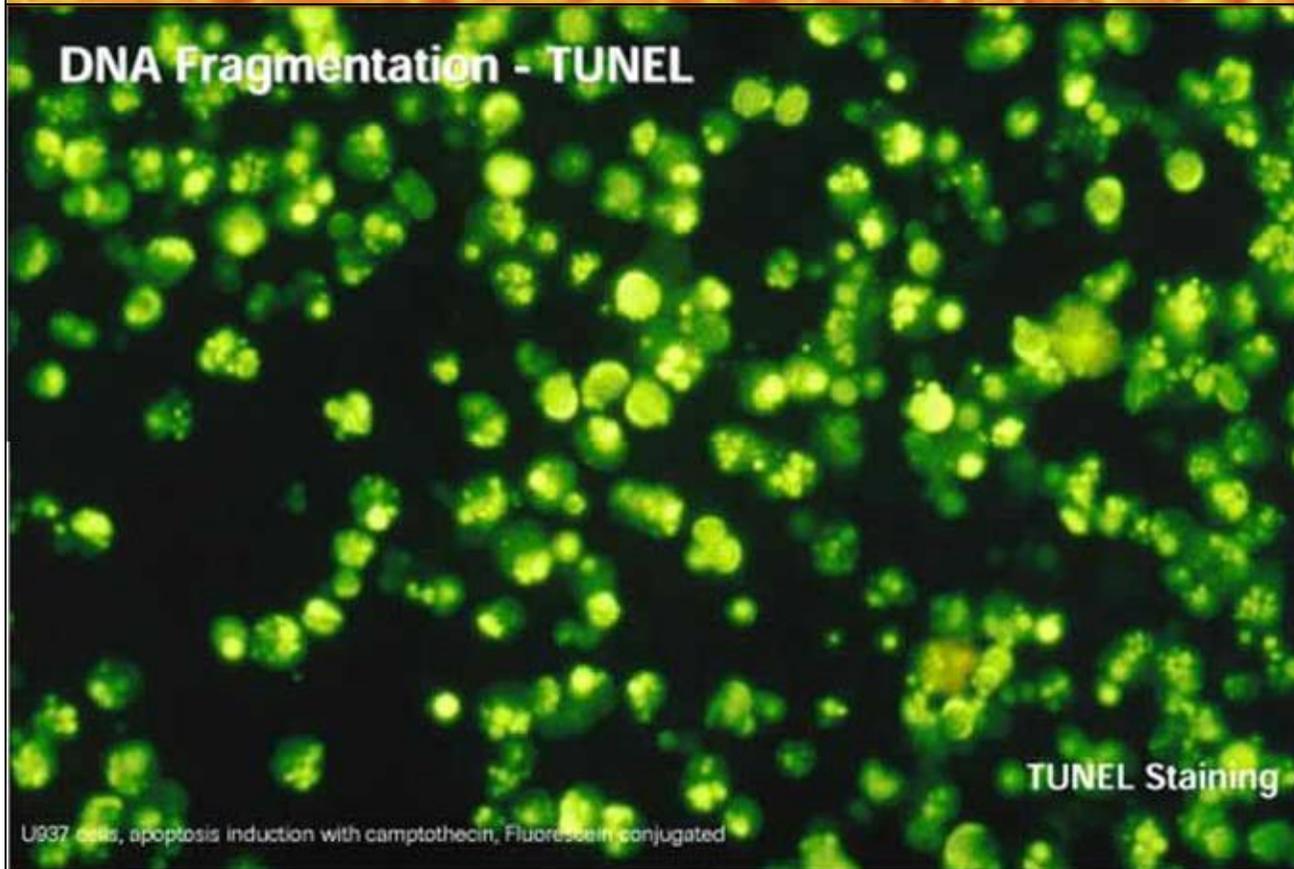
Aspect en échelle  
de l'ADN  
fragmenté

# Marquage des fragments d'ADN fragmentés et repérage in situ



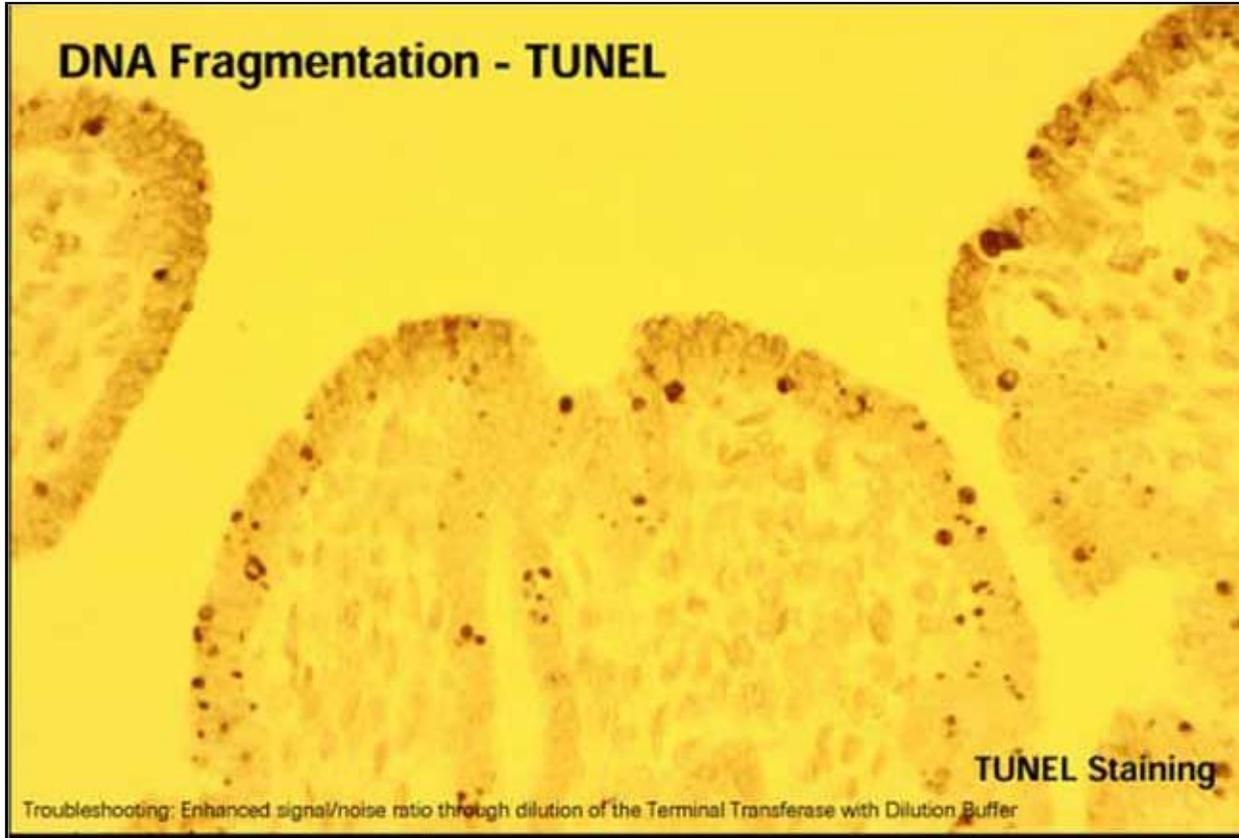


## DNA Fragmentation - TUNEL



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

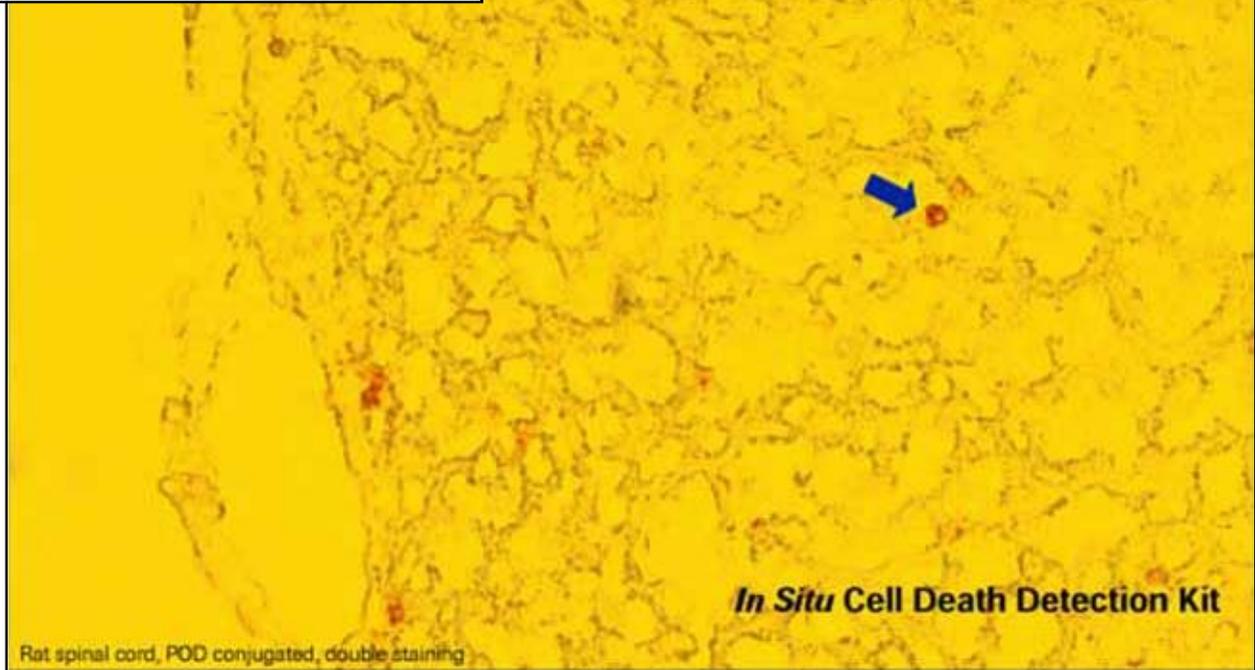
Diagnosics



***In Situ* Cell Death Detection Kit**

Rat endometrium, POD conjugated, counterstained with hematoxylin

- TUNEL

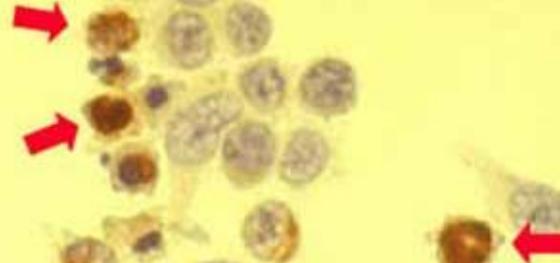


***In Situ* Cell Death Detection Kit**

Rat spinal cord, POD conjugated, double staining

# Activité caspase

## Caspase Activity



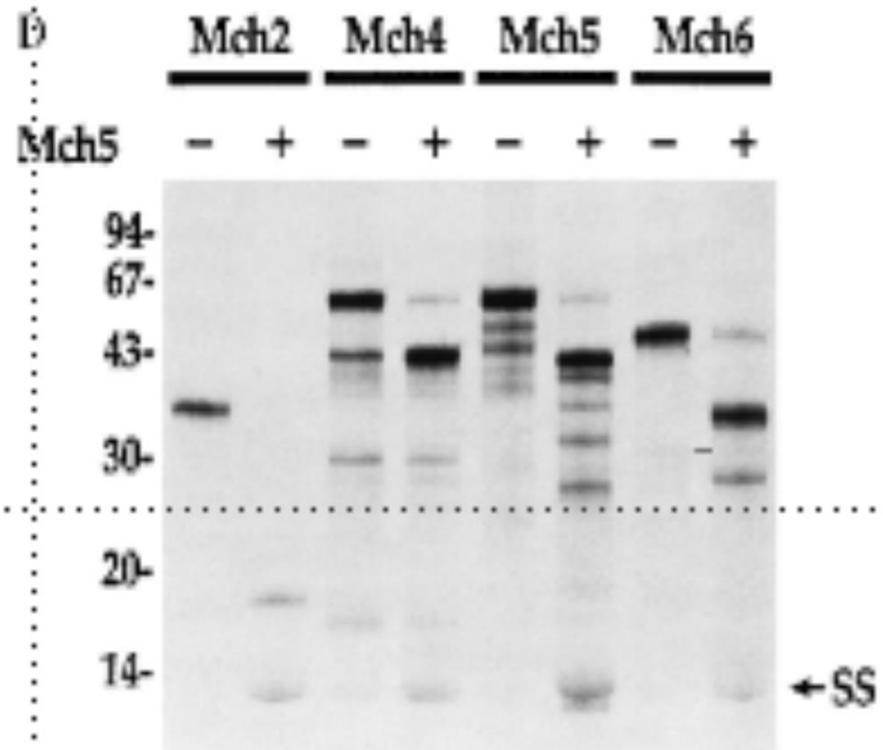
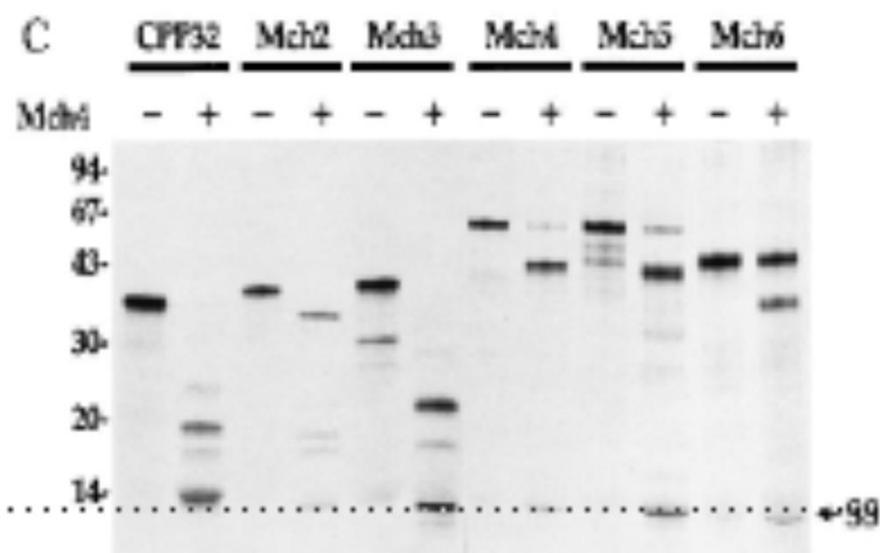
M30 CytoDEATH

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



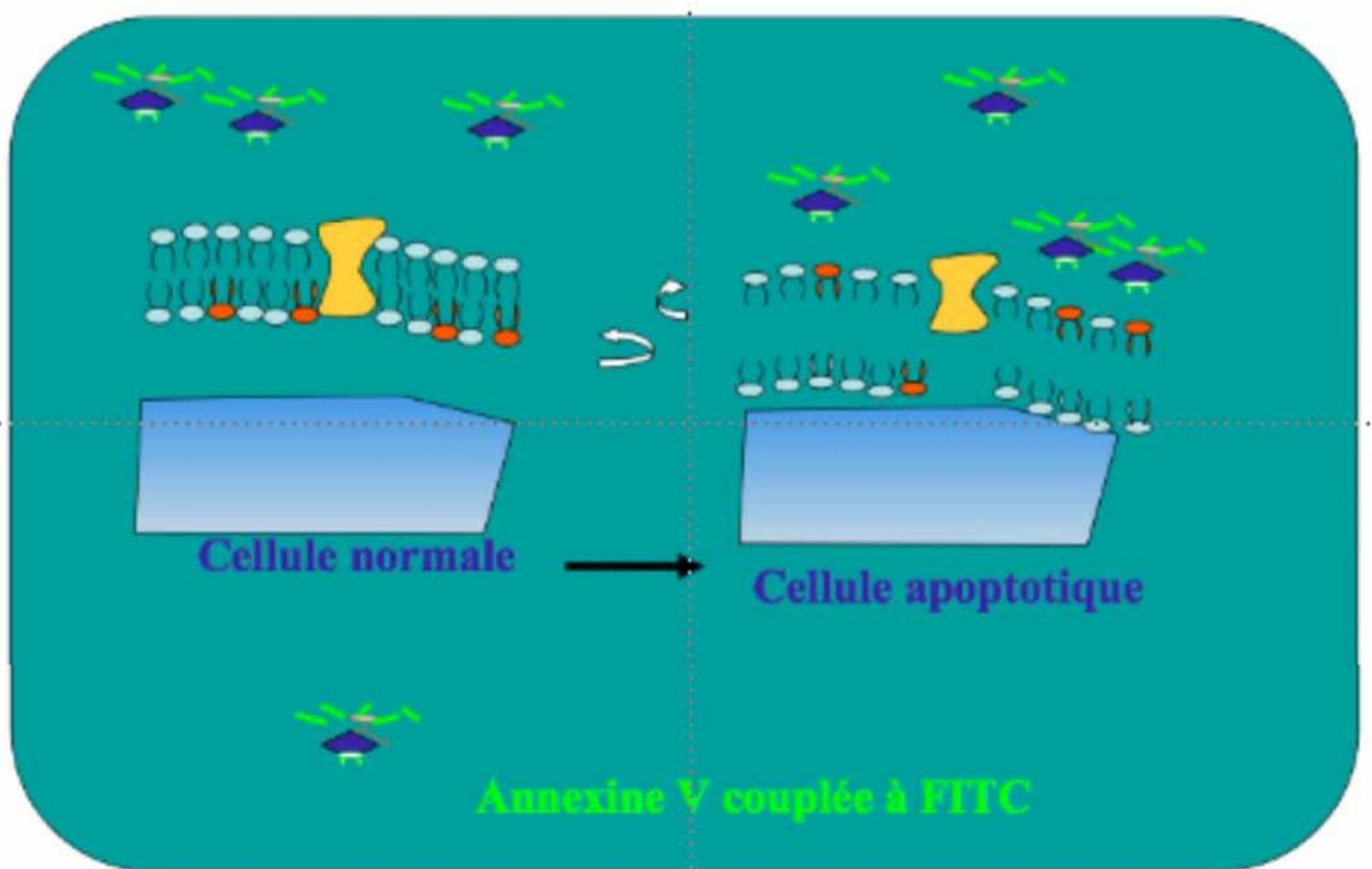
M30 CytoDEATH

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



	<b>Cellules normales</b>	<b>Cellules apoptotiques</b>	<b>Cellules nécrotiques</b>
<b>Annexine</b>	—	+	+
<b>Iodure propidium</b>	-	-	+

## Cell Membrane Alterations

necrotic



apoptotic



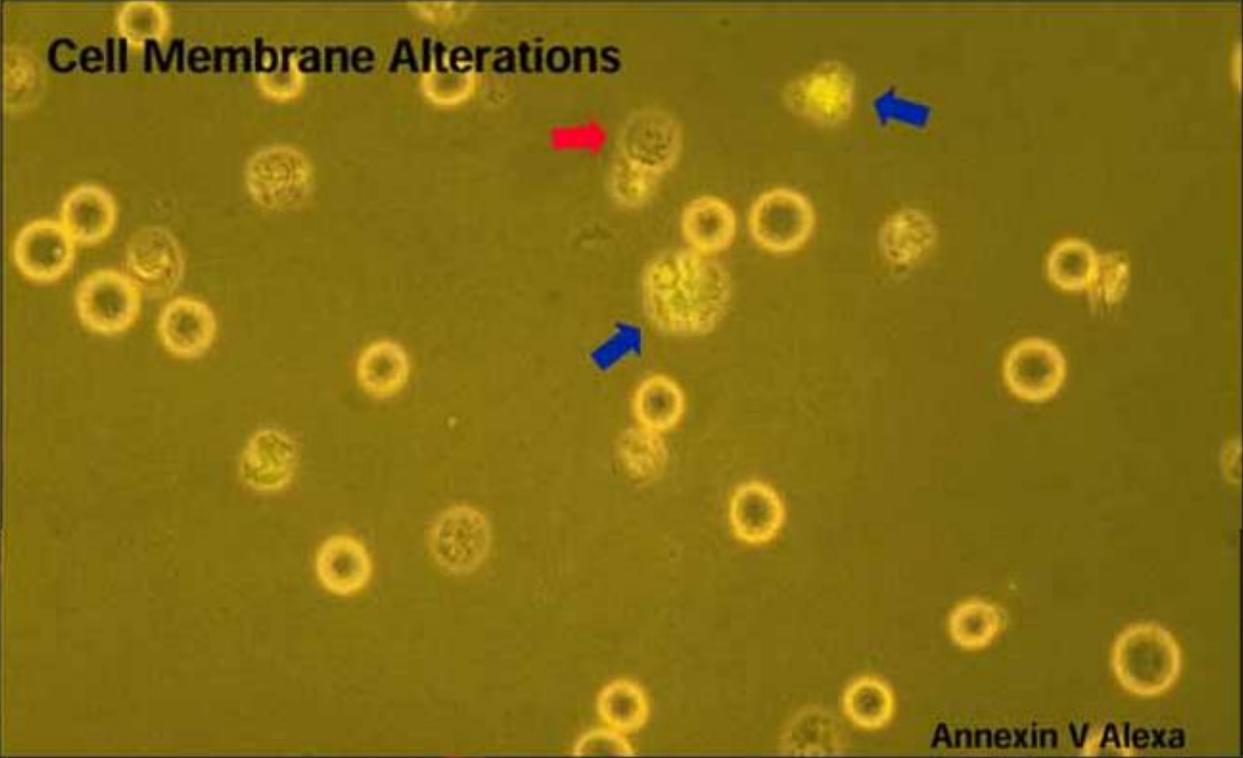
apoptotic



**Annexin V Fluos**

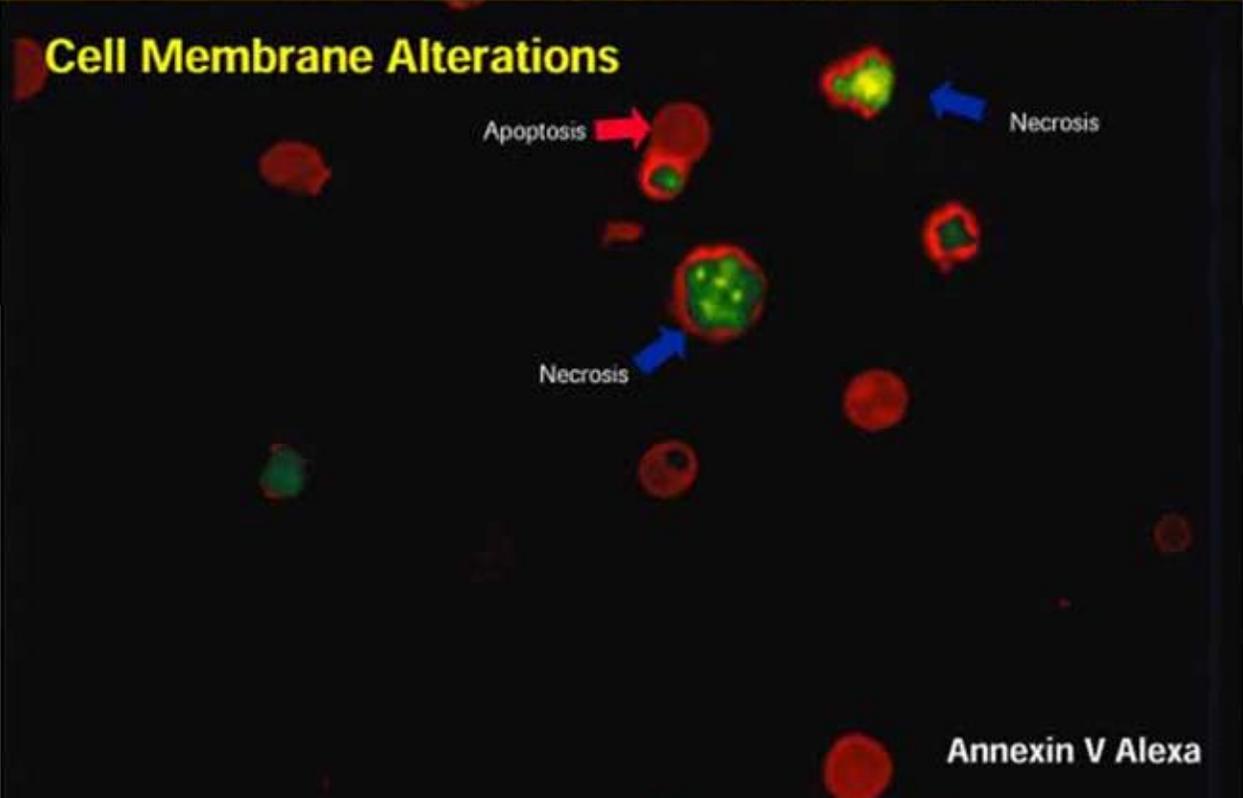
U937 cells, apoptosis induction with camptothecin, very late Apoptosis stage, detection with Annexin V Fluos (green), counterstaining with Propidium Iodide (necrotic cells)

### Cell Membrane Alterations



Annexin V Alexa

### Cell Membrane Alterations



Apoptosis

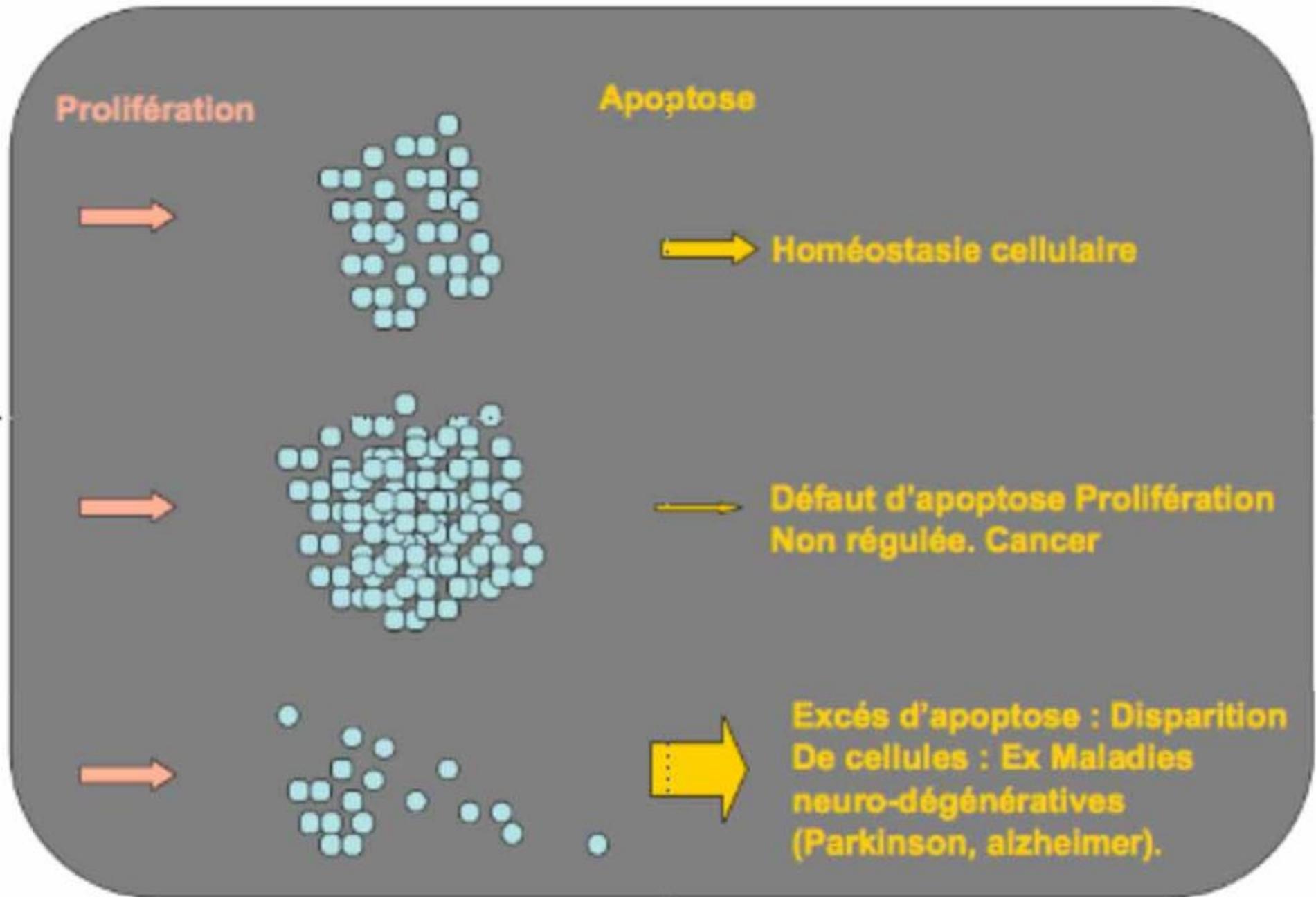
Necrosis

Necrosis

Annexin V Alexa

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.