Biologie cellulaire n ° 4 (P2)
Enseignant : **De Vernejoul**
Le 30/11/07 à 8h30
Ronéotypeur : Jérémy Djian

Mort cellulaire et biologie cellulaire du vieillissement

PLAN

I. LA MORT CELLULAIRE

1. Les différents types de mort cellulaire

2. Autophagie : survie cellulaire

3. Apoptose et autophagie

4. Apoptose

4.1. physiologie
4.2. Caspases
4.3. Fragmentation de l'ADN apoptotique
4.4. Caspases et fragmentation de l'ADN
4.5. Activation des Caspases
4.6. Apoptose : les 2 voies
4.7. Relargage de la mitochondrie
4.8. Inhibiteur physiologique de l'apoptose
4.9. P53 protéine pro apoptotique
4.10. Apoptose et cancer
4.11. Apoptose et vieillissement

II. BIOLOGIE CELLULAIRE DU VIEILLISSEMENT

1. Généralités

2. Les modèles de vieillissement

3. Les télomères

4. Rôle de la télomérase in vivo

5. Sénescence cellulaire et télomères

6. Gènes suppresseurs de tumeurs, sénescence et télomères

7. Maladies humaines monogéniques et vieillissement prématuré

7.1. Syndrome de Werner : vieillissement prématuré
7.2. Progeria (vieillissement précoce)

III. ENVIRONNEMENT ET VIEILLISSEMENT

1. restriction calorique et vieillissement

2. Les radicaux libres
2.1. consommation d'oxygène
2.2. Production et cibles
2.3. Production et défenses
2.4. radicaux libres et sénescence
2.5. Télomères et antioxydants : lien in vitro

3. Vieillissement : théorie générale

I. LA MORT CELLULAIRE

1. Les différents types de mort cellulaire

Il existe 4 types de mort cellulaire, chacune se définit par des **changements morphologiques** différents:

- ***Nécrose :***

Seul type de mort cellulaire dans laquelle les membranes (cytoplasmique et celles des organelles) vont être rompues. La cellule va gonfler.
On a une vacuolisation, une dégénérescence des organelles et un gonflement des mitochondries.
La chromatine n'est pas spécialement dégradée autours de la membrane nucléaire.
Etant donné que tout le contenu de la cellule est relargué à l'extérieur de la cellule, et en particulier les protéases, il y a une destruction du tissu autour de la cellule qui amène une **réaction inflammatoire** avec des monocytes et lymphocytes, ce qui n'est pas le cas pour les autres types de mort cellulaire.
C'est une mort accidentelle, aléatoire, qui dépend d'un événement extérieur à la cellule : la cellule est soumise soit à une infection, ischémie….

- ***Apoptose :***

La membrane forme des vésicules qui dépassent la taille normale de la cellule (en dehors de la cellule). A l'intérieur se créent des corps apoptotiques qui comprennent des fragments de noyau et de cytoplasme.
La chromatine se condense autours de la membrane. La présentation nucléaire de l'ADN se fait sous forme **d'échelles d'ADN** *(fragments d'ADN, voir 4.3).*
C'est une **mort programmé**, un mécanisme actif qui dépend des **caspases**.
Il n'y a **aucune inflammation** car les organites ne sont pas relargués à l'extérieur de la cellule mais restent à l'intérieur des membranes.

- ***Autophagie :***

Au départ c'est une manière pour la cellule de **survivre**.
La membrane forme des vésicules extérieures et il existe à l'intérieur plein de vésicules autophagiques plus ou moins pleines. Il y a condensation de la chromatine partielle et mais pas de formation d'échelles d'ADN. L'autophagie est indépendante des caspases.

- ***Sénescence :***

Arrêt de la réplication qui aboutit à la mort de la cellule. Il n'y a pas de gros changement dans la cellule si ce n'est qu'il y a un peu plus d'hétérochromatine. Le cytoplasme est aplati. Il y a plus d'enzyme à activité β-Gal.

➢ ***la nécrose cellulaire*** : processus non programmé dépendant d'un processus pathologique : Infection ischémie, inflammation

➢ ***apoptose et autophagie*** : processus régulés sans inflammation.

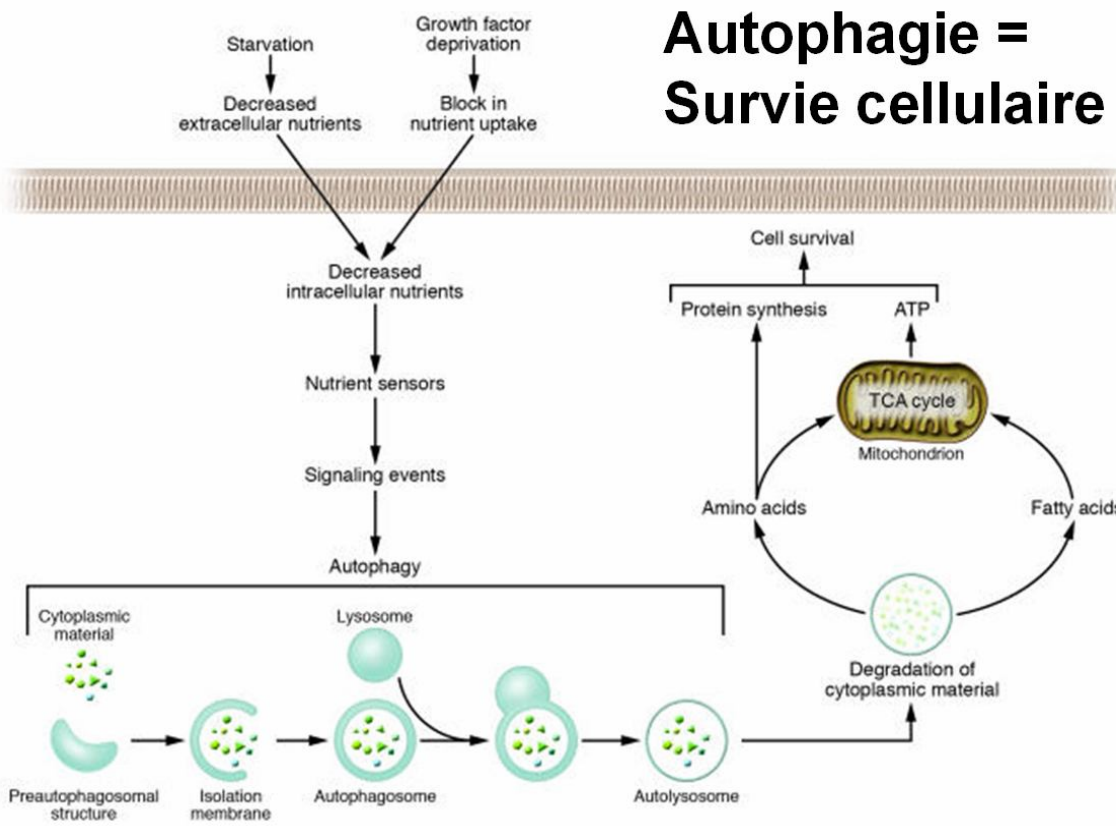
Quand on veut dégrader des protéines usées, 2 moyens :

❖ **l' ubiquitination** : l'enzyme ubiquitine ligase lie l'ubiquitine à une protéine, qui sera dégradée par des protéases dans le protéasome à pH neutre.

❖ **l'autophagie** : la cellule dégrade à l'intérieur d'elle-même des protéine **et** organelles entières

→ Différence entre les 2 : pendant l'ubiquitination il n'y a pas de membrane qui sépare le protéasome du reste de la cellule alors que pendant l'autophagie, le processus de dégradation s'effectue dans des membranes à l'intérieur de la cellule.

2. Autophagie : survie cellulaire



L'autophagie est un processus de survie cellulaire qui se déclenche lorsque la cellule n'a plus de facteurs de croissance, ou de nutriments.

On met ma cellule en culture dans un milieu où il n'y a pas assez d'acides aminés, de glucose. Elle manque donc de nutriment extracellulaire et de facteurs de croissance qui lui permettent de rentrer ces acides aminés, acides gras, nutriments à l'intérieure.
→ Le taux des nutriments intracellulaires diminue, ce qui donne le signal à la cellule pour déclencher l'autophagie.

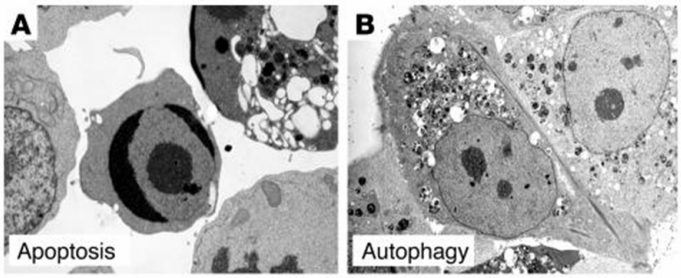
Sur le plan morphologique, le matériel cytosolique va être détruit et former des micronutriments :

Ce matériel (bouts de mitochondrie, de Golgi) se met à l'intérieur d'une membrane qui va s'isoler, qui provient d'un petit bout de membrane du réticulum endoplasmique. Une fois cette membrane fermée, on l'appelle **autophagosome** (auto → la cellule se mange elle-même).
Cette molécule fusionne avec un lysosome et devient un **autolysosome** où le vieux matériel cytosolique va être dégradé pour reformer des acides aminés, acides gras, qui vont servir à refaire la synthèse protéique et permettre la survie de la cellule.
(→ Moyen de dégrader les vieilles choses pour en faire de nouvelles)

On s'est aperçu que si ce phénomène est excessif, si ces vésicules sont trop nombreuses, la cellule est débordée → mort cellulaire.

3. Apoptose et autophagie

Cellules en culture in vitro



Lignée tumorale traitée par Un agent apoptotique (Fas L)

Lignée tumorale traitées par un agent anti cancéreux (tamoxifene)

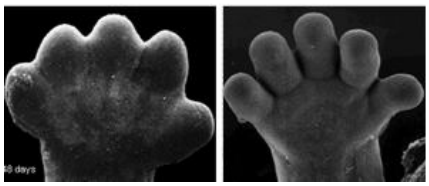
A: lignée tumorale cancer du sein, lignée traitée par un agent apoptotique (→ qui induit apoptose). La cellule meurt d'apoptose, tout est bien condensé, les membranes sont là.

B : cellule traitée par agent anti cancéreux, pas du tout même morphologie : toutes les vésicules à l'intérieur sont des vésicules d'autophagie qui aboutissent à la mort de la cellule.

→ Certains agents anticancéreux induisent la mort de la cellule par le stade d'autophagie et non pas par le stade de l' apoptose

4. Apoptose

4.1. physiologie



3 moments principaux :

- le développement : éliminer les tissus qui ne sont pas nécessaires.

Ex : mains d'un fœtus→ élimination du tissu interdigital

- immunologie : pour éliminer les lymphocytes qui reconnaissent le soi dans la circulation,
- éliminer les cellules infectées, cellules endommagées

4.2. Caspases

L'apoptose est une mort cellulaire qui dépend des caspases, enzymes qui sont des protéases qui hydrolysent des protéines comportant un acide aspartique.
Ces enzymes s'attaquent à des molécules impliquées dans la vie de la cellule ou y induisent des modifications

Elles entraînent:

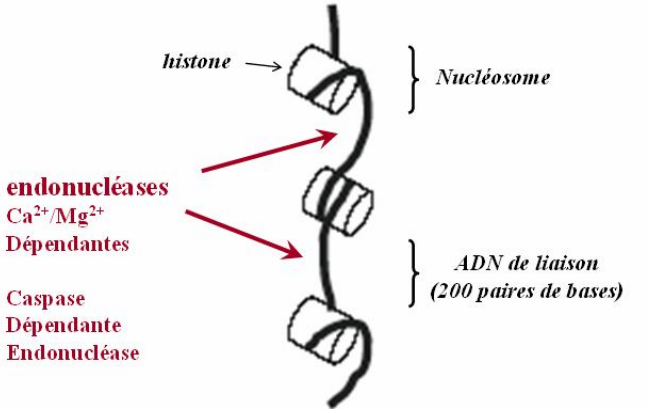
- une diminution des molécules impliquées dans la réparation de l'ADN.
- l'activation d'une enzyme. Il s'agit d'une endonuclease appelée **CAD** (caspase activated DNAse). Elle est capable de casser l'ADN et elle a la particularité d'activer les caspases.
- la destruction de protéines nucléaires : les **lamines**
- la destruction de composants du cytosquelette : βcaténine, filament d'actine FAK,…

→ Donc détruisent des structures indispensables au maintien cellulaire normal.

4.3. ***Fragmentation de l'ADN apoptotique***

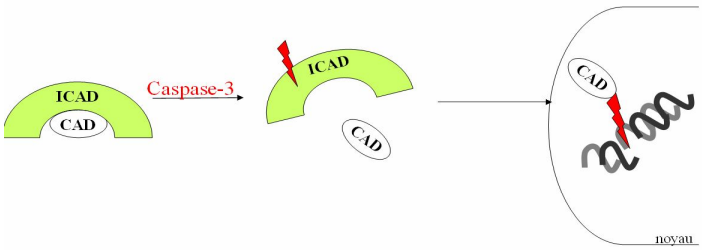
Entre chaque nucléosome, il existe 200pB. L'endonuclease clive l'ADN entre les nucléosomes donc en fragments qui font toujours environ 200pB → **échelles d'ADN de 200 pB** (alors qu'en nécrose, l'ADN est coupé un peu partout).

Quand on veut montrer dans un article que la cellule est bien morte par apoptose, on regarde si l'ADN est dégradée sous forme d'échelles.



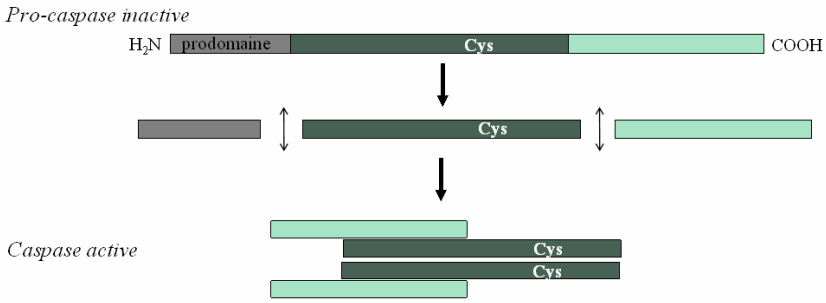
4.4. ***Caspases et fragmentation de l'ADN***

CAD est une endonuclease Mg2+ dépendante.
Pour que la CAD soit activée, il faut simplement que sont inhibiteur, **ICAD**, soit enlevé.
Lorsque la caspase est activée (caspase 3 ici), elle s'attaque à ICAD en le cassant.
CAD, détaché de ICAD, peut passer dans le noyau pour s'attaquer à l'ADN.
La caspase n'agit pas directement sur la DNAse mais **indirectement** en intervenant sur son inhibiteur.



4.5. ***Activation des Caspases***

Les caspases dans la cellule ne sont jamais à l'état activé : elles sont a l'état de pro enzyme
→ **pro caspase inactive .**
Il faut que ce soit une autre caspase, ou une autre protéine qui les active : cela consiste à enlever la partie NH2 terminale (pro domaine), et la partie C terminale.



Les deux parties centrales peuvent alors se lier par des liaisons ponts di-sulfure SH--SH aux parties COOH terminales : ce sont des homodimères
→ Donc **nécessité d'un clivage pour être actives**

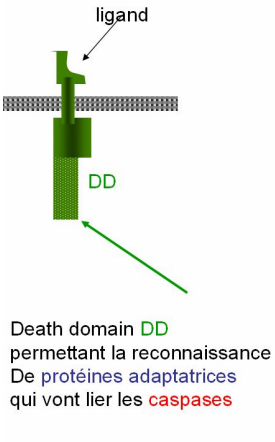
4.6. ***Apoptose : les 2 voies***

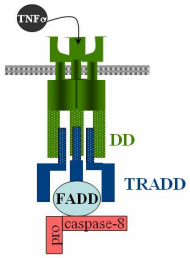
Voie interne ou voie de ma mitochondrie :

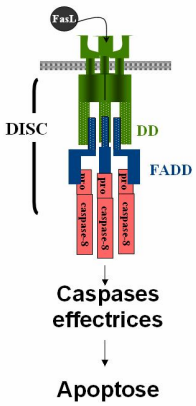
La mitochondrie relargue du **cytochrome C** qui induit le facteur **APAF 1** qui se lie à une **caspase 9.** Un autre facteur **AIF** (*Apoptose Inducing Factor : AIF est une protéine de l'espace inter membranaire)*, et la caspase 9 vont être capable d'activer les caspases effectrices 3, 6 et 7.

Voie externe :

Le signal qui vient de l'extérieur de la cellule. Il existe 2 récepteurs de la mort. Ce sont des récepteurs transmembranaires qui fixent un ligand et qui possèdent dans leur domaine intra cellulaire un domaine de la mort. L'inter domaine permet la reconnaissance de la protéine adaptatrice qui lie les caspases et les activent.







2 principaux récepteurs de la mort :

- **Récepteur du TNF**
- **Récepteur Fas** (FasL = ligand)

Ces récepteurs ont le même domaine. Ils lient des protéines adaptatrices FADD et TRADD *(pas important détails)*, capables de lier la pro caspase 8. Dès que le ligand est lié au récepteur

→ **activation de la pro caspase inactive en caspase active.**

4.7. Relargage de la mitochondrie

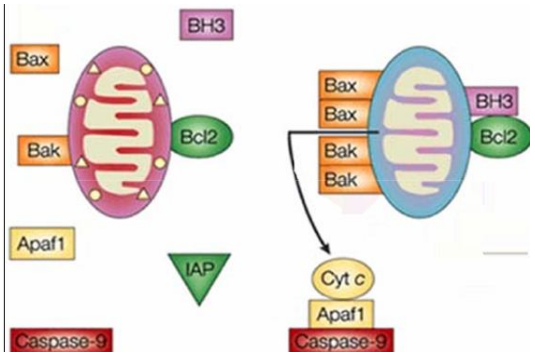
Sa perméabilité va être changée

Il existe deux familles de protéines liées à la membrane des mitochondries :

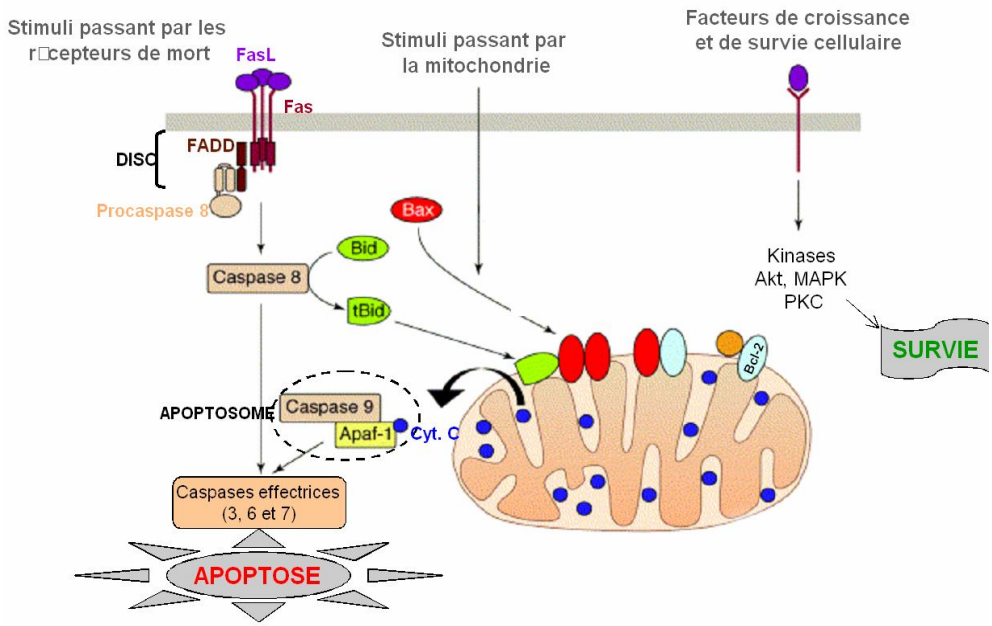
- **BAX** : protéines de la mort (pro apoptotique)
- **BCL** : protéines de la survie (anti apoptotique)

Elles sont capable de former des homo ou hétérodimère : BAX-BAX / BAX-BCL, leur ratio détermine la perméabilité de la mitochondrie

- Si il y a **plus de BAX**, il y a relargage de Cyt C et AIF → **apoptose**
- Si il y a **plus de BCL**, pas relargage → **survie cellulaire**



Résumé apoptose



Il peut y avoir un lien entre les 2 voies :

La voie externe active la caspase 8, qui active un facteur qui induit la perméabilisation de la mitochondrie, donc active en plus la voie interne.

Il existe des facteurs de croissance et survie cellulaire AKT (PKB), MAPK, PKC.

4.8. Inhibiteur physiologique de l'apoptose :

- IAP (inhibiteur de l'apoptose chez le baculovirus: famille de virus en bâtonnets)
- Survivine (présente uniquement dans les cellules des tissus en développement et cellules cancéreuses. Elle appartient a famille des IAP)
- XIAP

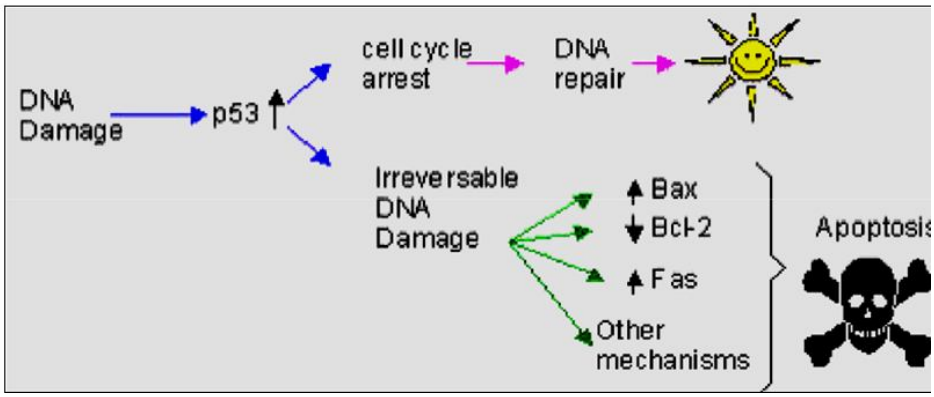
On les retrouve dans les cellules qui n'ont pas beaucoup d'apoptose : les cellules cancéreuse (Prolifération → pas beaucoup d'apoptose)
On a pensé que ça pourrait être la cible de traitements anticancéreux.
Mais on prend des souris invalidées pour XIAP, on ne trouve pas de liaison clinique clair…

4.9. P53 protéine pro apoptotique

- Elle se fixe sur le promoteur d'une CDI qui est **P21**.
- Elle induit aussi la transcription de BAX, qui induit l'apoptose
- Elle induit la transcription de AIF *(faute dans diapo, AIF et pas AIP)* et des récepteurs de la mort.

L'ADN qui a subit des modifications exprime p53, on a soit :

- arrêt du cycle cellulaire avec transcription de P21 (*voir la cascade de signalisation en bioch*) qui ralentit le cycle jusqu'à réparation de l'ADN
- mort cellulaire si les dégâts sont irréversibles → expression de BAX, FasL…



4.10. Apoptose et cancer

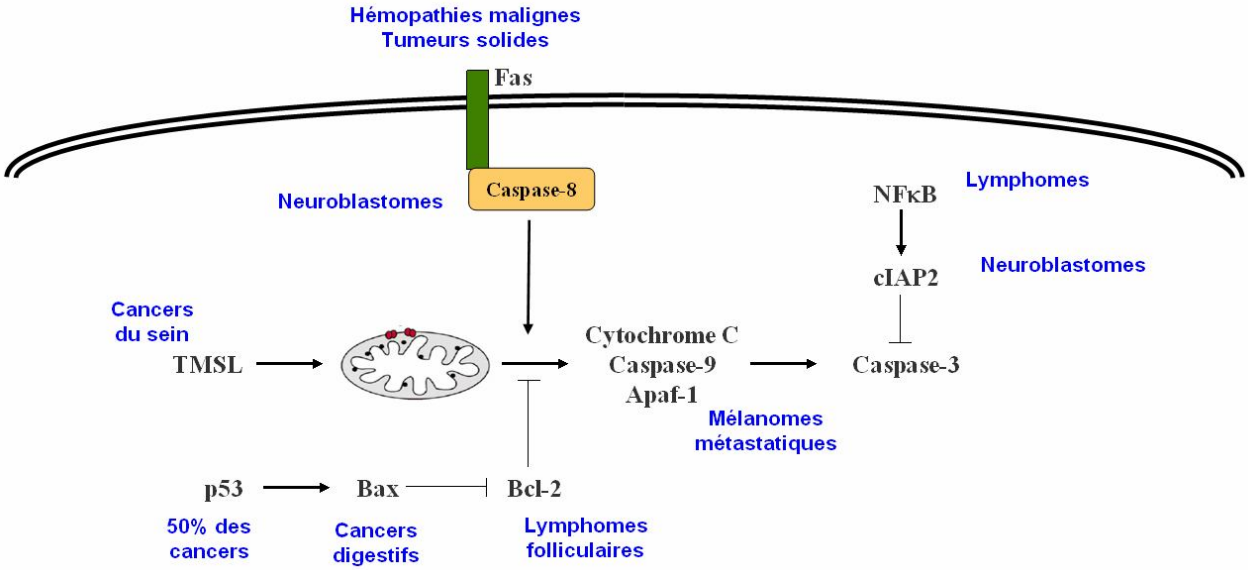
Trop de cellules prolifèrent mais il n'y a pas assez de cellules apoptotiques, ce qui participe autant qu'une prolifération excessive à la survenue de cancer.
Des arguments moléculaires vont dans ce sens :

- BCL facteur de survie est augmenté très souvent dans les tissus cancéreux, il favorise la prolifération, il a donc un **rôle d'oncogène**.
- Il y a aussi une diminution de l'expression de p53

On essaye de faire des drogues, pour traiter les cancer, afin d'augmenter l'apoptose des cellules.

Il existe des mutations dans certaines tumeurs de gènes qui agissent dans la voie de l'apoptose.
Ex gènes mutés : Inhibiteur de l'activation de l'apoptose, caspase 9, Bcl2, p53 (50% cancers), FasL…
Ce ne sont pas des mutations germinales mais des mutations dans la tumeur (≠ maladies génétiques)

L'analyse moléculaire des mutations somatiques présentes dans les tumeurs a révélé que de nombreux gènes agissant sur les voies de signalisation et d'exécution de l'apoptose sont affectés dans les tumeurs.



4.11. Apoptose et vieillissement

Le lien le plus évident entre apoptose et vieillissement se trouve au niveau du système nerveux central.
→ **L'apoptose des neurones augmente avec l'age.**
Il y a augmentation des cancers avec l'âge due en partie à un manque de défenses apoptotiques.

II. BIOLOGIE CELLULAIRE DU VIEILLISSEMENT

1. Généralités

Il y a quelque chose de génétique dans le vieillissement : la durée de vie est différente suivant les espèces (homme, tortue ;-), souris, mouche …)
Il y a une ressemblance familiale de la durée de vie (*famille de centenaires par exemple*)
Il y a des maladies humaines dues à une mutation dans un seul gène responsable de vieillissement accéléré

→ Il y a un contrôle génétique du vieillissement : il existe quelque chose dans le gène qui prédit quelle durée de vie on va avoir.
Mais il ne faut pas oublier l'environnement qui va favoriser le vieillissement (essentiellement l'accumulation des radicaux libres)

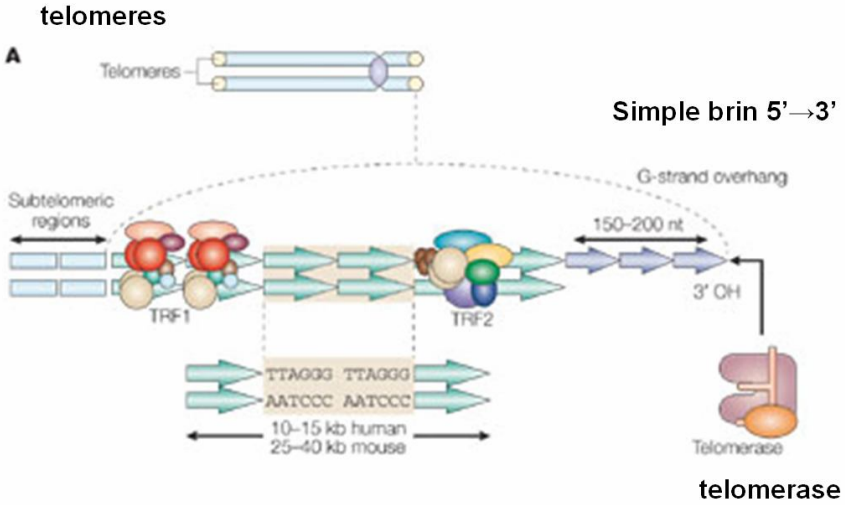
2. Les modèles de vieillissement

- modèle en culture : si l'on prend des cellules humaines, la prolifération cellulaire va varier en fonction de l'âge du donneur : d'autant plus de cycle que le sujet est plus jeune. Ce sont des cultures de fibroblastes cutanés : modèle de sénescence réplicative : modèle Hayflick
- modèles des animaux in vivo
- maladies humaines monogéniques avec vieillissement prématuré
- modèles de souris invalidées pour un gène ou de race de souris avec vieillissement prématuré

Soit modification du gène, soit modification de l'environnement.

3. Les télomères

Parties aux extrémités des chromosomes. Région d'environ **10/15 kb**. Dans la **partie 3'OH**, il y a un seul brin d'ADN car lors de la réplication de l'ADN, il aurait fallut une autre amorce pour que le 2eme brin se fasse. Donc à chaque réplication, l'ADN perd au niveau des télomères quelques nucléotides → une enzyme, la **télomérase**, essaye d'en ajouter pour éviter que ça ne se raccourcisse.

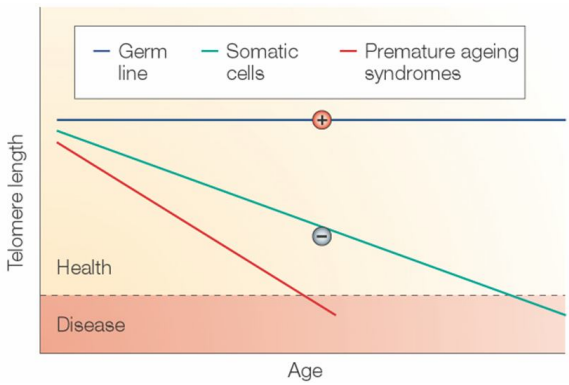


Les télomères sont des séquences répétées qui ne codent pour aucune protéine : il s'agit d'hétérochromatine constitutive (extrêmement condensée). **L'histone H3** est méthylé, ce qui induit une protéine, **HP1**, spécifique de l'hétérochromatine, qui vient se fixer sur l'H3 méthylé : la chromatine est donc très condensée.

En l'absence de télomérase, il y a normalement un **raccourcissement chez l'homme de 15 à 50 nucléotide**s à l'extrémité de chacun des chromosomes.
→ Télomérase : reverse transcriptase, n'est pas présente en grande quantité dans toutes les cellules : il y en a dans cellules germinale, cancéreuses et souches mais **quasiment pas ou pas du tout dans les cellules somatiques.**

Il existe des complexe protéiques TRF1 TRF2 : dans ces complexes accrochés à l'ADN des télomères, des protéines servent à la stabilité et réparation de l'ADN en encadrant les séquences répétées TTAGGG. Si les gènes de ces protéines sont mutés : vieillissement, cancer

Le gène de la télomérase : **Htert**. La télomérase synthétise le brin 3' 5' grâce à une amorce d'ARN (TERC)
Au cours du vieillissement, dans les cellules somatiques, la taille des télomères diminue.
Dans les maladies où il y a un vieillissement précoce, la taille des télomères raccourcit plus vite.
Par contre ils restent identiques dans les cellules germinales.
Si pas assez de télomérase→ raccourcissement des télomères.
Altération de l'ADN si les télomères sont trop petits
→ Instabilité génétique.



4. Rôle de la télomérase in vivo

Les souris invalidées pour le gène de la télomérase, ont :
- une longévité diminuée
- une perte de fertilité
- une atrophie de plusieurs tissus → insuffisance rénale
- moins de cancer, à la différence du vieillissement chez l'homme
- une augmentation de p53 dans les tissus

5. Sénescence cellulaire et télomère

On met des fibroblastes en culture qui prolifèrent d'autant moins que le sujet est âgé.
Si on transfecte ces cellules avec Htert, gène de la télomèrase, elles prolifèrent éternellement, elles deviennent immortelles mais non cancéreuses.

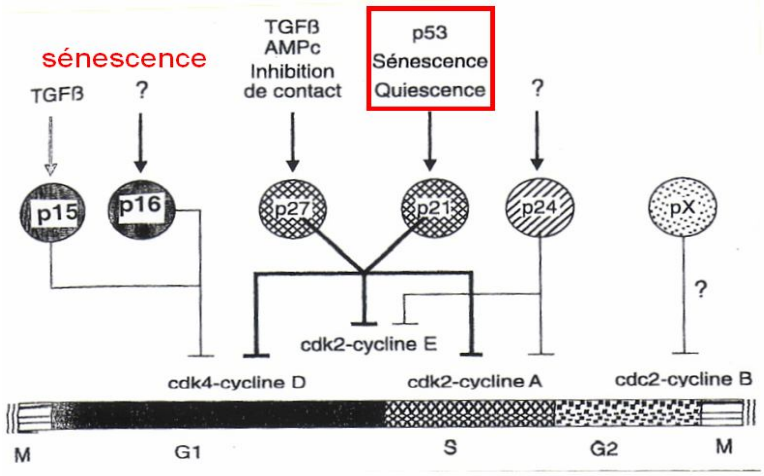
Par contre, s'il y a diminution de la télomérase, c'est reconnu comme une cassure de l'ADN, donc il y a induction de la synthèse de p53, donc arrêt du cycle cellulaire et/ou apoptose…

CDI= inhibiteur de CDK

Il y en a 2 impliqués dans la sénescence :

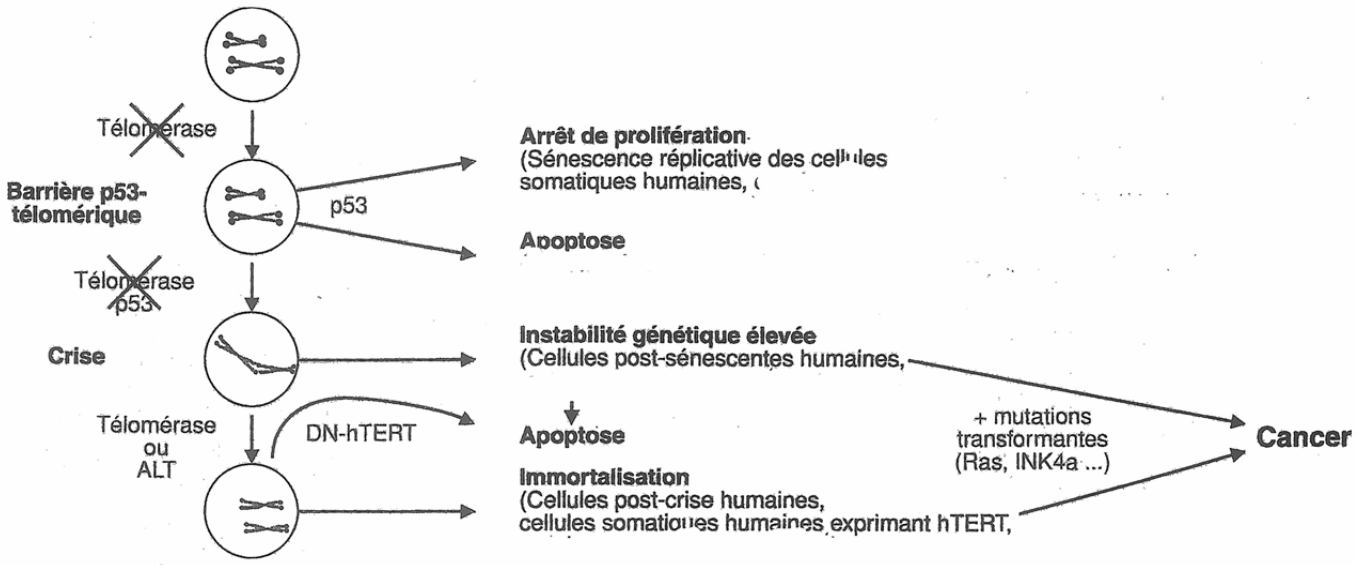
- **P21**
- **P16**

Pour que les cellules épithéliales restent immortelles, il faut inactiver en plus de l'introduction de Htert, p16 (pas besoin pour les fibroblastes), car il est augmenté dans les cellules sénescentes. Il existe aussi dans les cellules sénescentes une augmentation de p19 qui inhibe MDM2 qui inhibe p53…



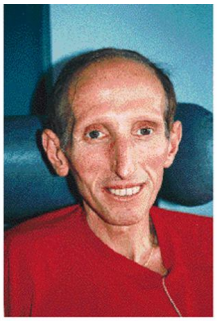
6. Gènes suppresseurs de tumeurs, sénescence et télomères

Quand les cellules ont des télomères qui raccourcissent, il y a induction de p53, donc une barrière qui fait que les cellules arrêtent de proliférer et rentrent en apoptose. Certaines cellules arrivent à passer cette barrière p53 et entrent dans ce qu'on appelle une « crise » et continuent de proliférer malgré leur ADN altéré car leurs télomères ont disparu, ce qui induit une instabilité génétique. Cependant elles vont tout de même mourir, par un renouveau de p53.
Mais si on ajoute à ce moment la télomérase et un oncogène, il y a induction d'un cancer.
Si ces barrières physiologiques ne marchent pas bien
→cancer



7. Maladies humaines monogéniques et vieillissement prématuré

7.1. Syndrome de Werner : vieillissement prématuré



Homme de 37 ans, arthrose, athérosclerose … meurt à age prématuré.

Mutation d'un **gène d'une helicase** nécessaire au développement de l'ADN pendant sa réparation, donc il n'y a pas de réparation physiologique de l'ADN (mutation UV…), ce qui induit le vieillissement prématuré.

7.2. Progeria (vieillissement précoce)

Vieillissement encore plus précoce que Werner

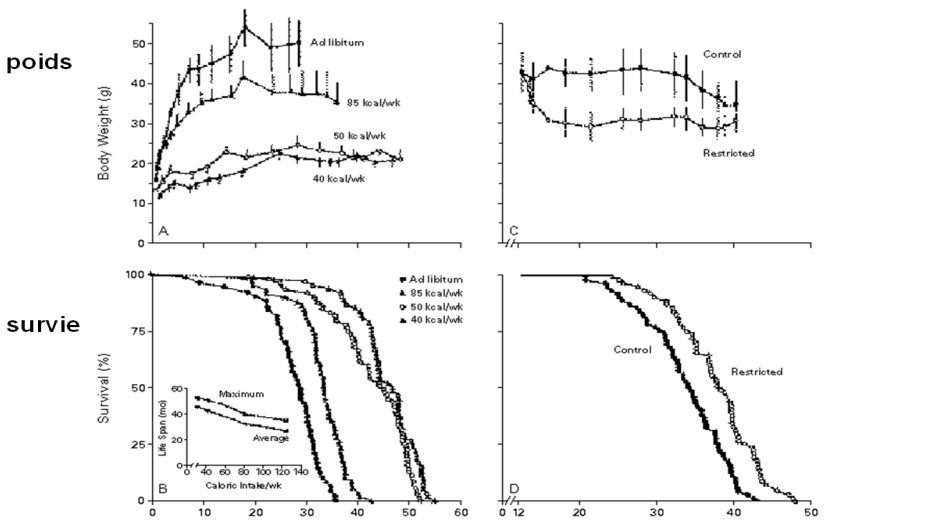
- Autosomale dominant : 100 cas rapportés
- Diagnostique vers 2 ans, vieillissement très accéléré : rides, arthrose, pertes de cheveux. Mort vers 13 ans d'insuffisance cardiaque (pas de cancer)
- Mutation dans le gène de la **lamine A : LMNA**

On colore les lamines d'un sujet normal qui sont à la face interne du noyau.
Chez sujet anormal, au lieu de faire une enveloppe ronde, c'est tout crénelé → fragilité nucléaire qui entraîne une mort cellulaire.

III. ENVIRONNEMENT ET VIEILLISSEMENT

1. restriction calorique et vieillissement

Article récent de 2005 :
Un moyen d'augmenter la durée de vie des souris est de limiter leurs apports alimentaires.
On met des souris dès leur plus jeune âge en restriction calorique. Elles peuvent vivre jusqu'à 60 mois (5 ans), ce qui est énorme, comparé à 35 mois pour celles qui ont mangé normalement.
Dans le cas de souris adulte, on a aussi une durée de vie augmentée.
Cependant on ne sait pas si ces souris sont en forme, si elles résistent bien aux infections…



Souris C3B soumises à une restriction Calorique depuis la naissance

Souris C3B soumises à une restricti calorique depuis l'âge de 12 mois

Mécanismes

- Diminution des dégâts oxydatifs (*on ne verra que ça dans ce cours*)
- Diminution des produits de glycation (sucres particuliers sur protéines)
- Diminution des fonctions reproductives (c'est fatiguant de se reproduire…donc comme elles se reproduisent moins étant donné qu'elles sont maigres, elles vivent plus longtemps)
- Diminution des taux d' IGF (facteur de croissance)

2. Les radicaux libres

2.1. consommation d'oxygène

Les souris qui mangent moins consomment moins d'oxygène donc elles produisent moins de radicaux libres. On pense que c'est un des moyens par lequel la restriction calorique intervient sur le vieillissement.

2.2. Production et cibles

On ajoute un électron à l'oxygène ce qui forme l'anion super oxyde. Il s'associe à 2 H+ pour former le peroxyde d'hydrogène capable de se transformer en radical hydroxyle.

- Radicaux libres de l'oxygène : O^{-}_{2} = Anion superoxide
- $O^{-}_{2} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2$ = peroxyde d'hydrogène
- $OH^{\cdot}$ =Radical hydroxyle. Le plus réactif

Ces radicaux vont :

- Attaquer les lipides → diminution de la fluidité des membranes
- Oxyder les bases de l'ADN → lésion de l'ADN
- Attaquer les protéines → inactivation de certaines enzymes

2.3. Production et défenses

La génération des radicaux libres se fait par:

- Transport d'électron de la mitochondrie
- βOxydation des acides gras dans les peroxysomes
- Cytochrome P450
- Les phagocytes activés

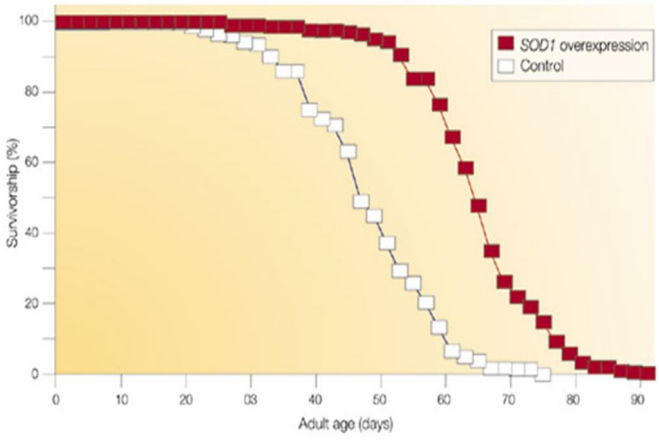
Les moyens de défense contre les radicaux libres, sont :

- La **superoxyde dismutase** (SOD) permet de transformer O2- EN H2O2
- La **glutathion peroxydase** transforme l' H2O2 en H20
- Des radicaux hydrophiles : vitamine C,
- lipophiles : vitamine E
- et aussi flavonoide, carotène, glutathion réductase.

Application

Chez la mouche, on surexprime la SOD : sa durée de vie sera plus importante, jusqu'à 90 jours au lieu de 70.

Il y a donc un lien entre production de radicaux libre et vieillissement.



2.4. radicaux libres et sénescence

C'est peut être dû a une augmentation des dégâts produit par les radicaux libres.
2 arguments sont possibles :

- Il y a une diminution des systèmes de défense avec l'âge : il y aurait moins de SOD, glutathion réductase, vitamine C, E.
- Aussi possible que l'on produise plus de radicaux libres.

Dans ce cas le vieillissement serait une conséquence des altérations des macromolécules par des réactifs oxygénés.

2.5. Télomères et antioxydants : lien in vitro

Les lésions de l'ADN dues à son oxydation peuvent être responsable du raccourcissements des télomères et du phénomène de sénescence réplicative in vitro.
On peut mettre cela en évidence dans une boite de culture :

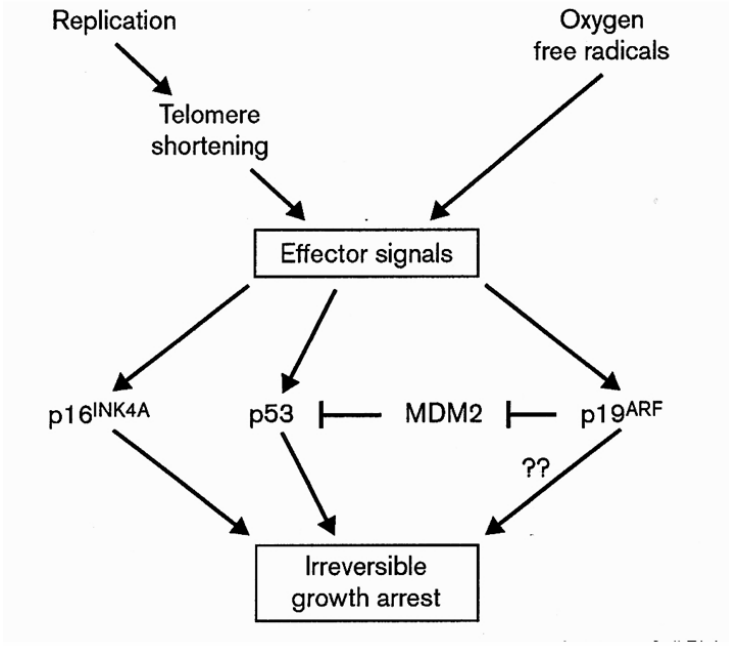
- Soit exposition brève à l'H2O2
- Soit une culture avec 40% d'O2

→ Diminution de la longueur des télomères
→ Arrêt de croissance
In vitro, la production de radicaux libres induit un vieillissement

3. Vieillissement : théorie générale

Le raccourcissement des télomères, ainsi que les radicaux libres entraînent l'augmentation de p53 et p16 qui induisent une diminution du cycle cellulaire.

La tortue à 3 orteils peut se reproduire jusqu'à 70 ans (« comme Yves Montant », dit-elle).
Rouget de roche : 205 ans.



Merci à Ptit Coq, Jade, ma Couille au miel, Saucisse, et ma super tortue…