

Chapitre 9 :

Apoptose : mécanismes moléculaires et méthodes d'étude

Dr. Marie BIDART

Plan du cours

- Mécanismes moléculaires de l'apoptose
 - Deux grandes voies de signalisation
 - La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort
 - La voie intrinsèque ou voie mitochondriale
 - Les principaux acteurs de l'apoptose
 - Les caspases
 - La famille Bcl2
- Méthodes d'étude de l'apoptose

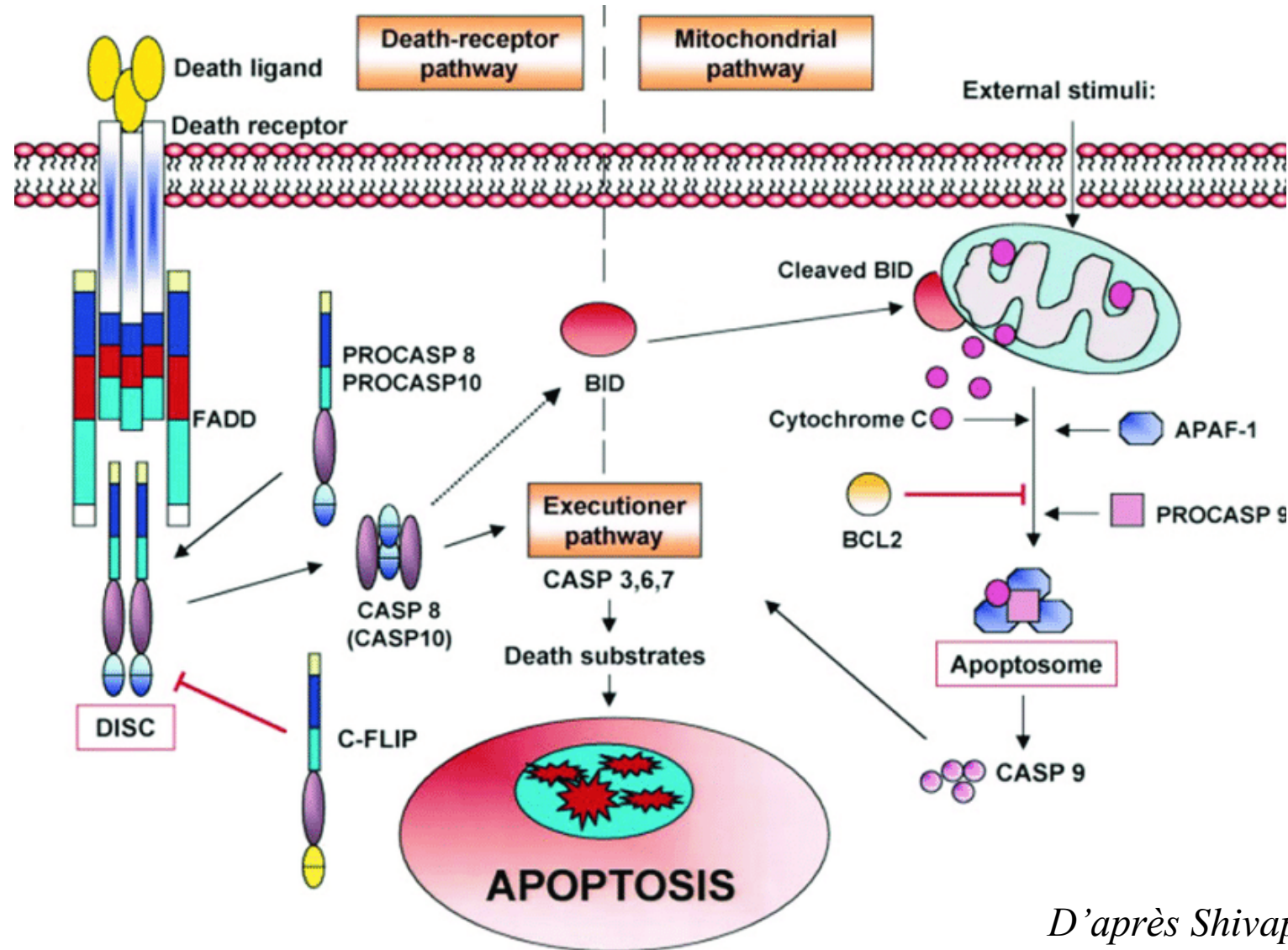
Objectifs pédagogiques du cours

- Objectif 1 : Connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus d'apoptose et ses principaux acteurs
- Objectifs 2 : Maîtriser les techniques d'étude de l'apoptose

Apoptose, mécanisme moléculaire

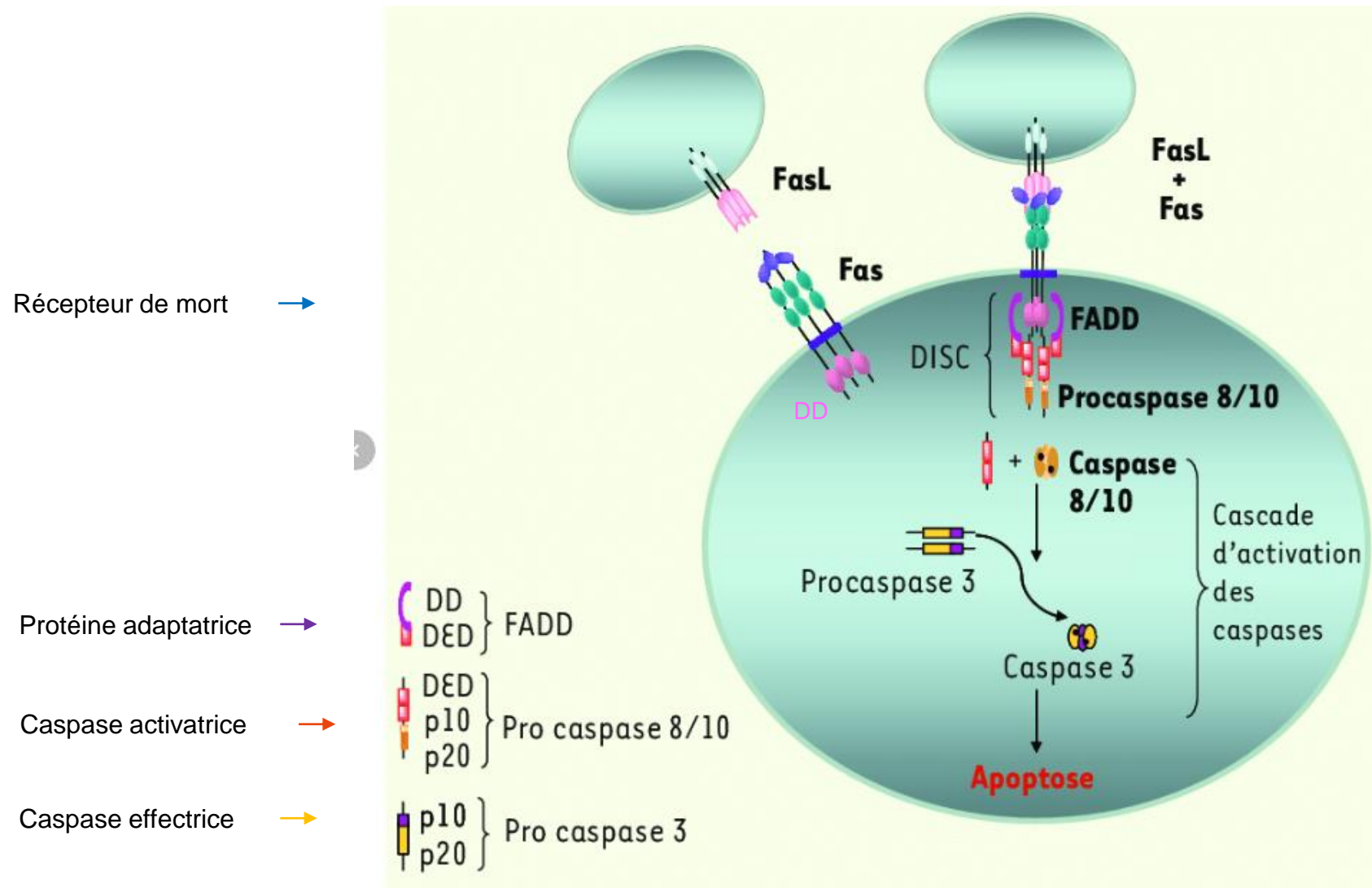
- 3 phases de l'apoptose :
 - Phase d'initiation : activation des signaux externes ou internes
 - Phase de décision : activation de protéases cellulaires
 - Phase de dégradation : formation des « corps apoptotiques » et phagocytose

Deux grandes voies apoptotiques

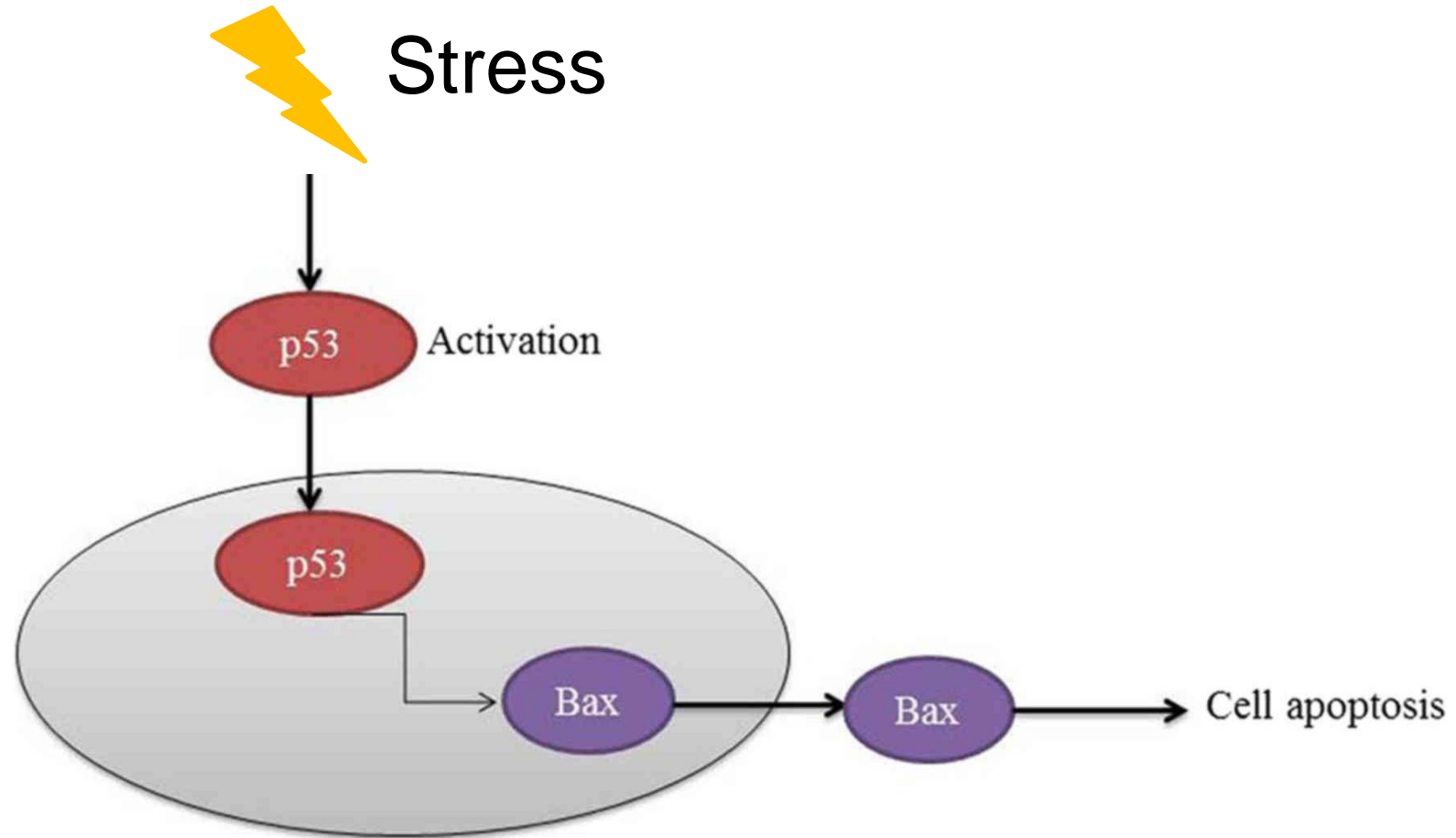


D'après Shivapurkar, et al., 2003

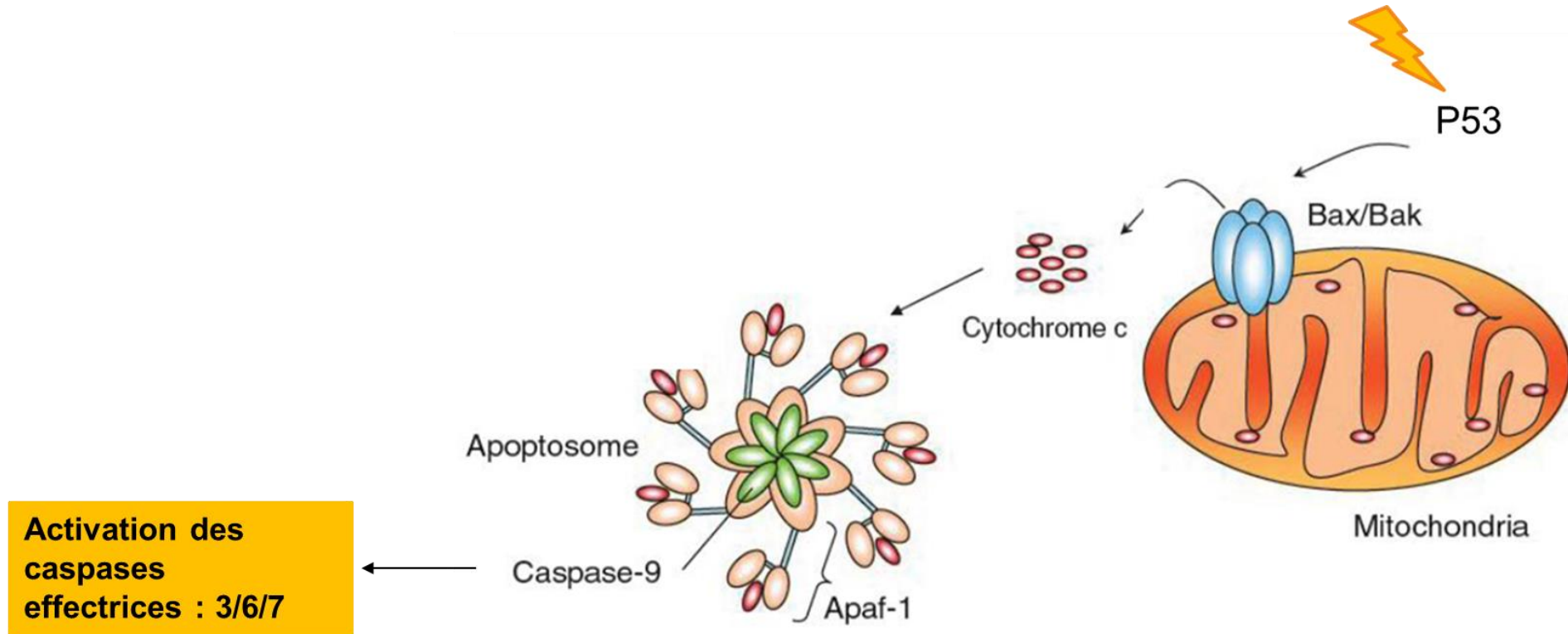
La voie des récepteurs de mort : voie extrinsèque



La voie mitochondriale : voie intrinsèque



La voie mitochondriale : voie intrinsèque



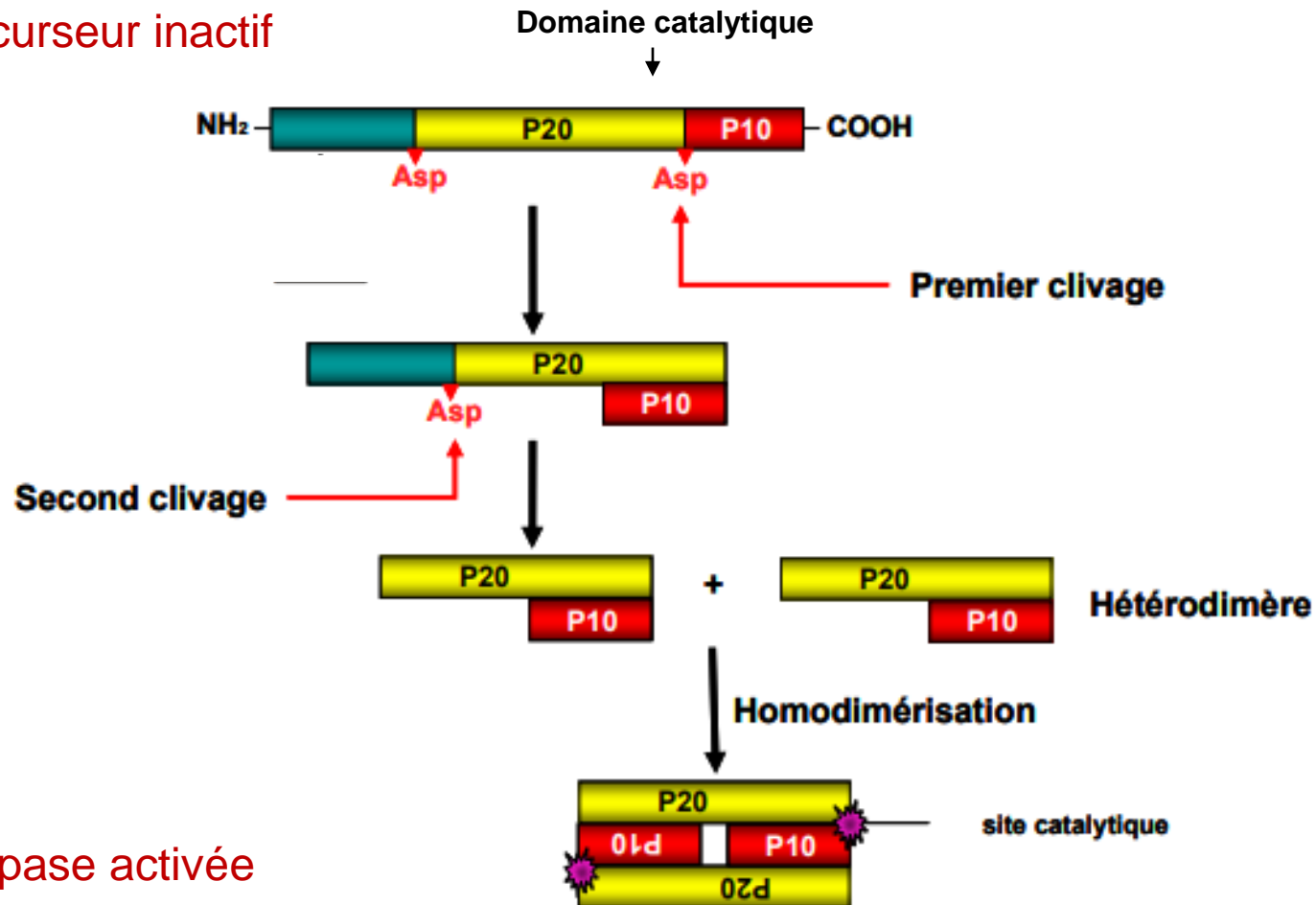
Les acteurs de l'apoptose

➤ Caspases

➤ Famille Bcl2

Les caspases

Précurseur inactif



Caspase activée

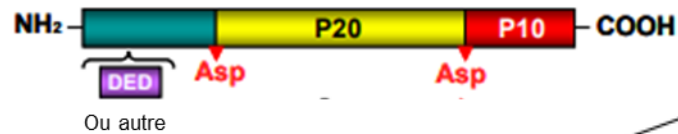
- 14 membres
- Pro-enzyme : 30 à 50 kDa
- Précurseur inactif
- Domaine N-terminal peu conservé
- Domaine P20 et P10 conservé
- Spécificité de substrat : clivage après résidu aspartique

Formation d'un hétérotétramère
ou homodimère

Les caspases : cascade d'activation

signal inducteur = signal apoptotique

procaspases initiatrices (inactives) $\xrightarrow{\text{auto activation}}$ caspases initiatrices (actives)



Caspases initiatrices : 2,8,9,10,12

procaspases effectrices (inactives) $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ caspases effectrices (actives)



Caspases effectrices : 3,6,7

Protéolyse de substrats (nucléaires, cytoplasmiques)

Les membres de la famille Bcl-2

- Ils contrôlent le relargage des facteurs apoptogènes de la mitochondrie.
- Ils se divisent en deux sous familles :

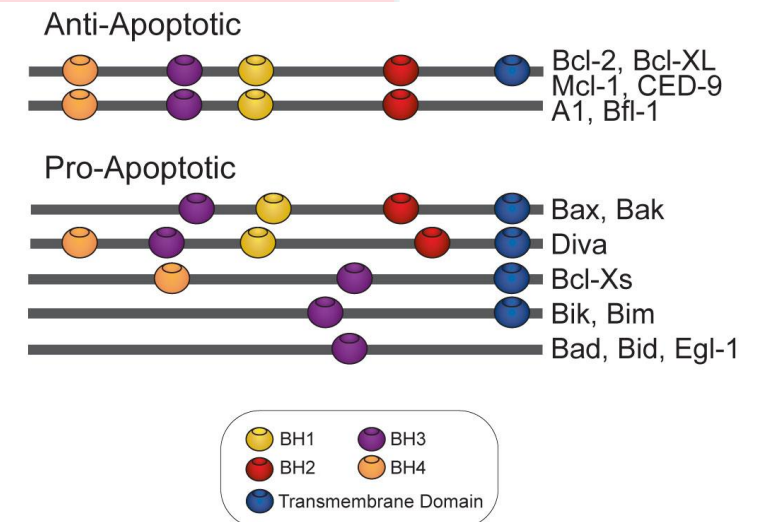
Anti-apoptotiques

- Bcl-2
- Bcl-xl
-

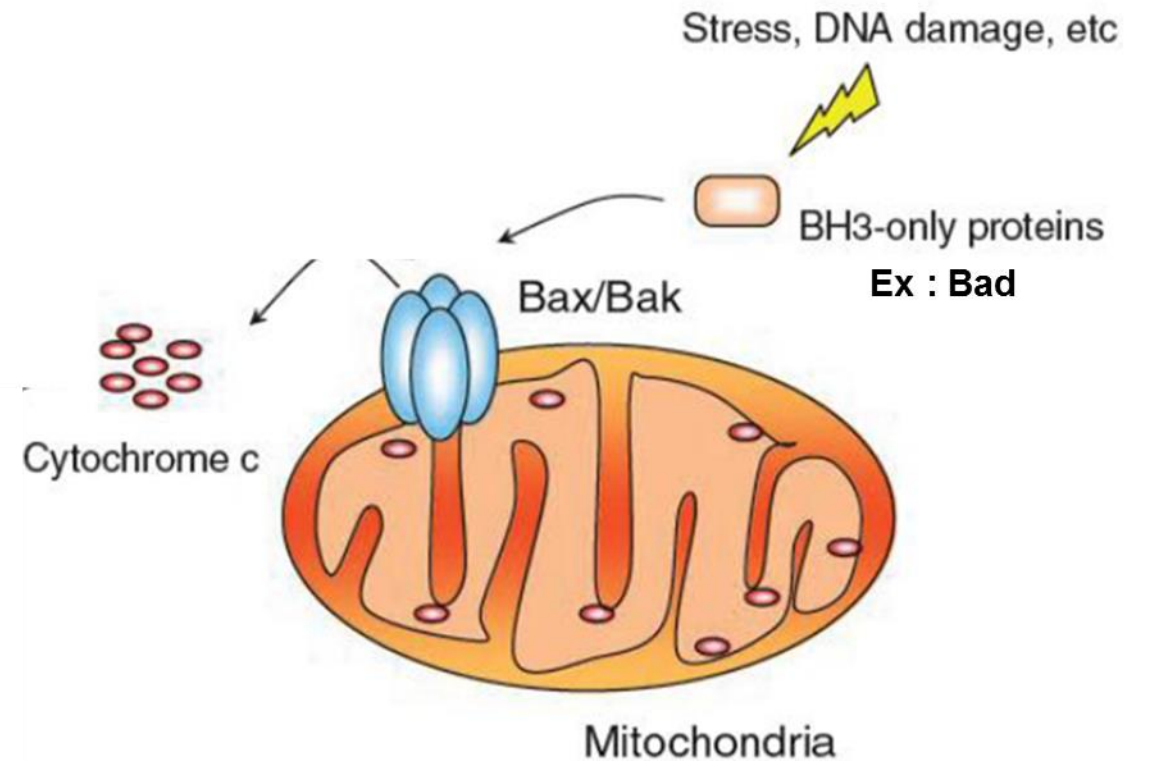
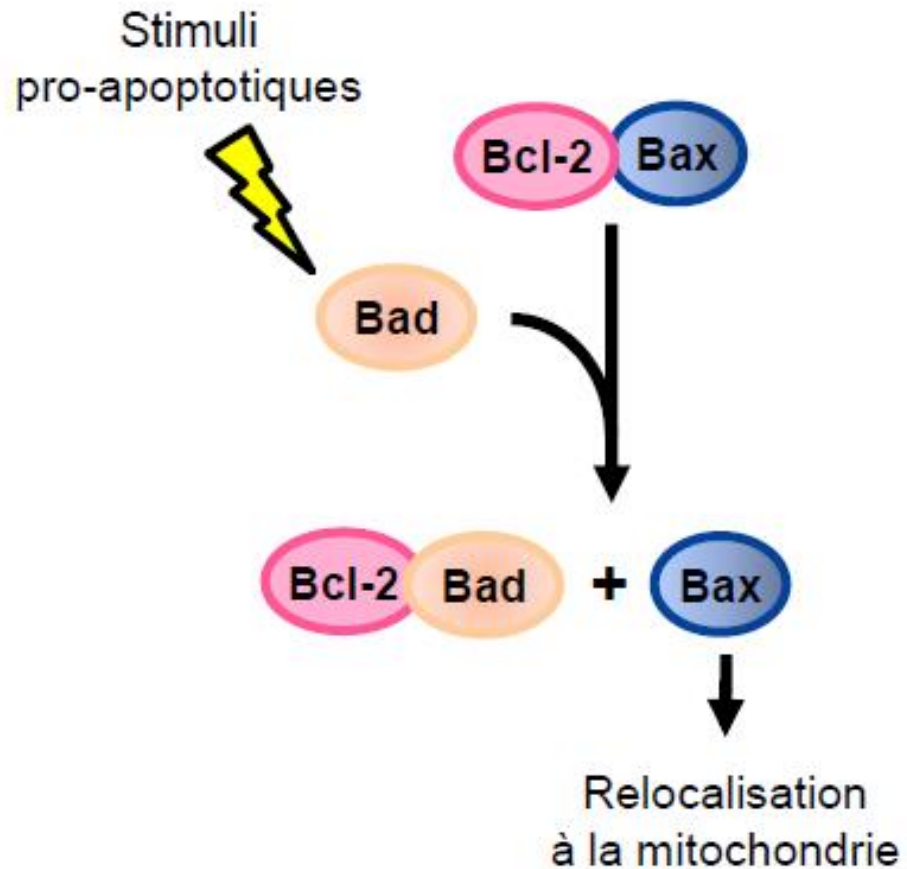
Pro-apoptotiques

- Bax like (Bax, Bak ...)
- BH3-only (Bad, Bid, Bim...)

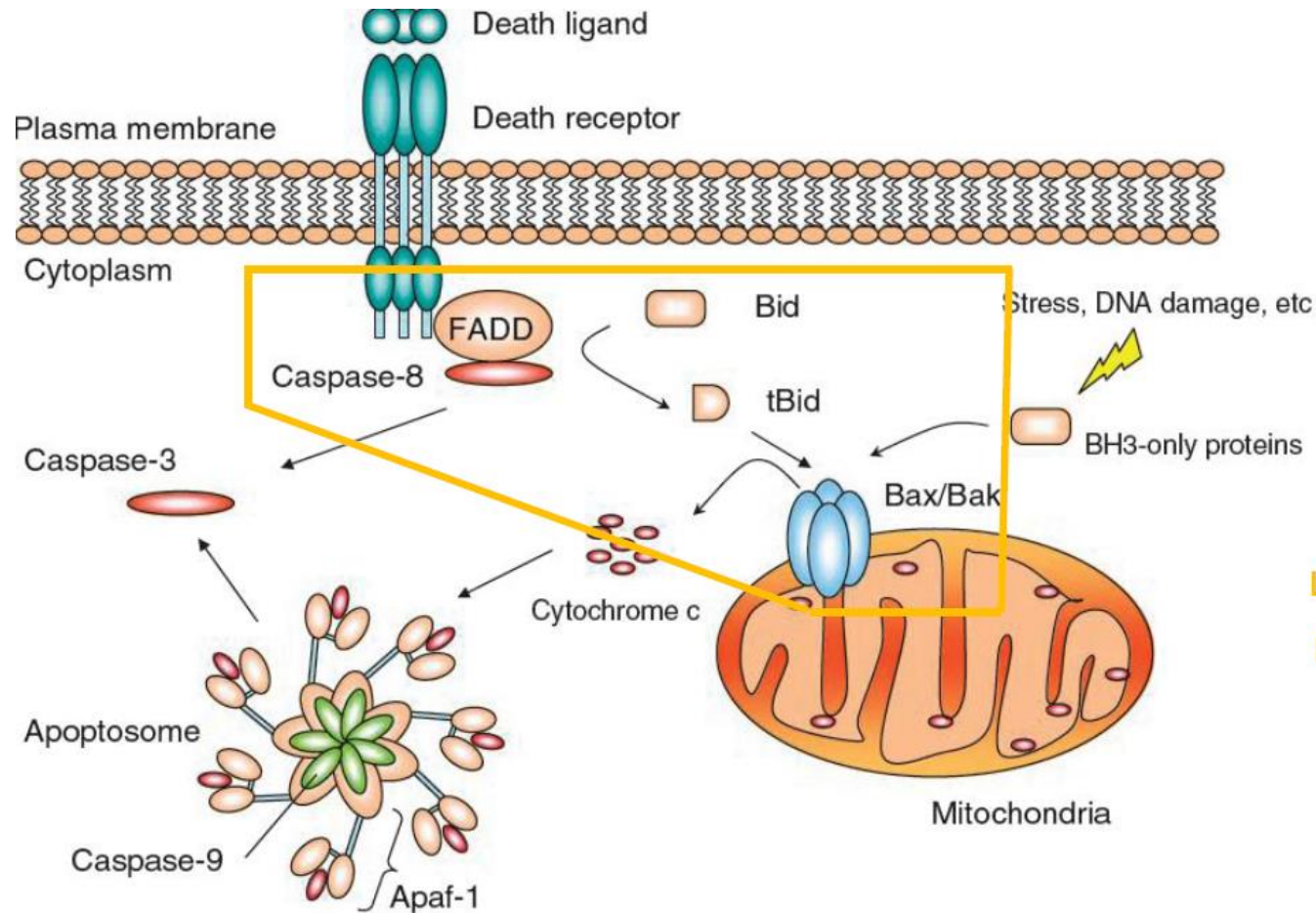
- L'interaction des facteurs pro-apoptotiques et apoptotiques régule la sensibilité des cellules à l'apoptose.



Les membres de la famille Bcl-2



Interaction des voies intrinsèques et extrinsèques

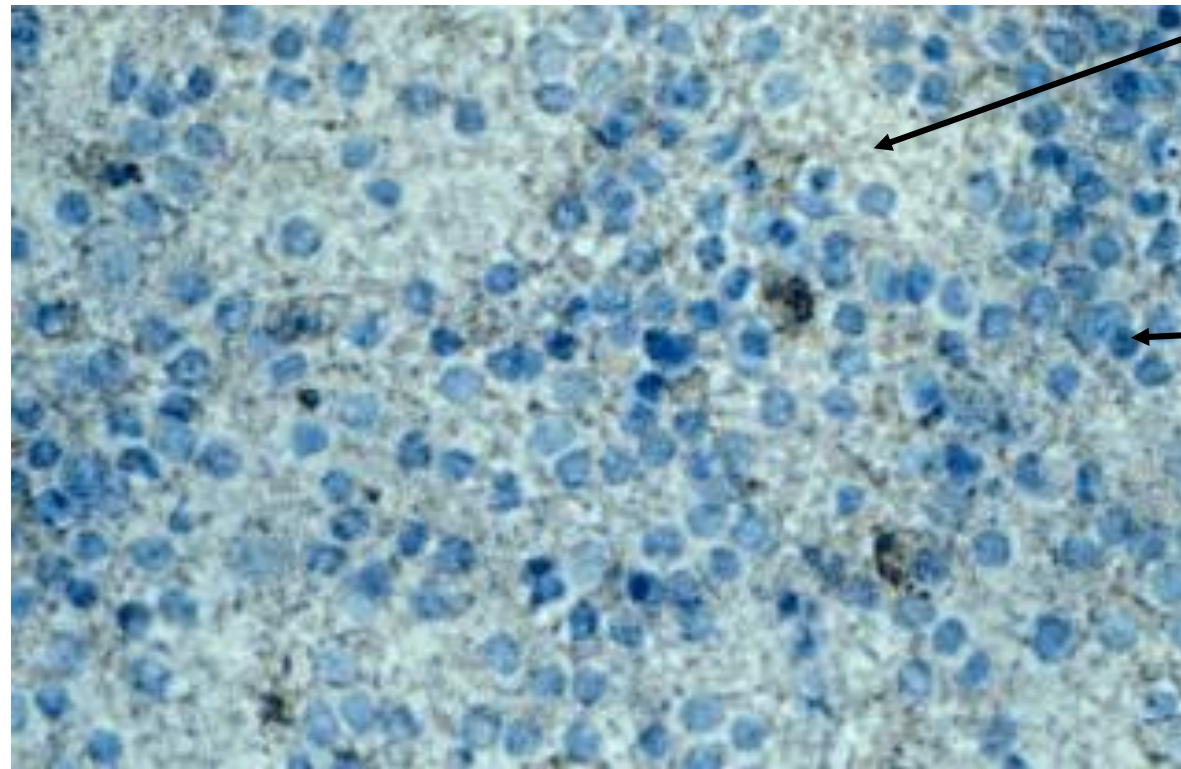


La voie des récepteurs de mort
peut aussi induire le relargage
du cytochrome c
-> amplification du signal

Méthode d'étude de l'apoptose

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

Mise en évidence de cellules mortes par microscopie optique



Cellules
vivantes

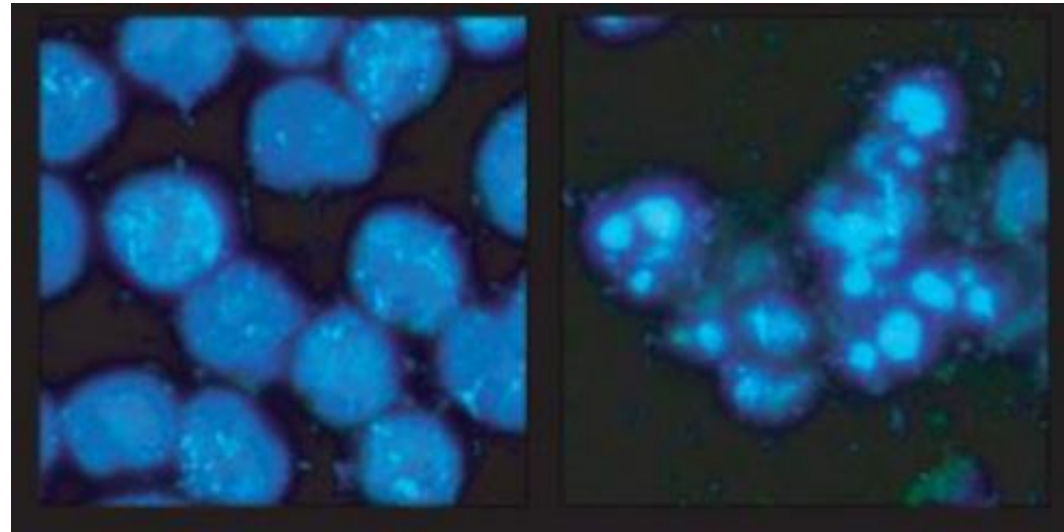
Cellules
mortes

Apoptose, mise en évidence de la condensation de la chromatine

Cellule normale

Cellule en
apoptose

Chromatine homogène

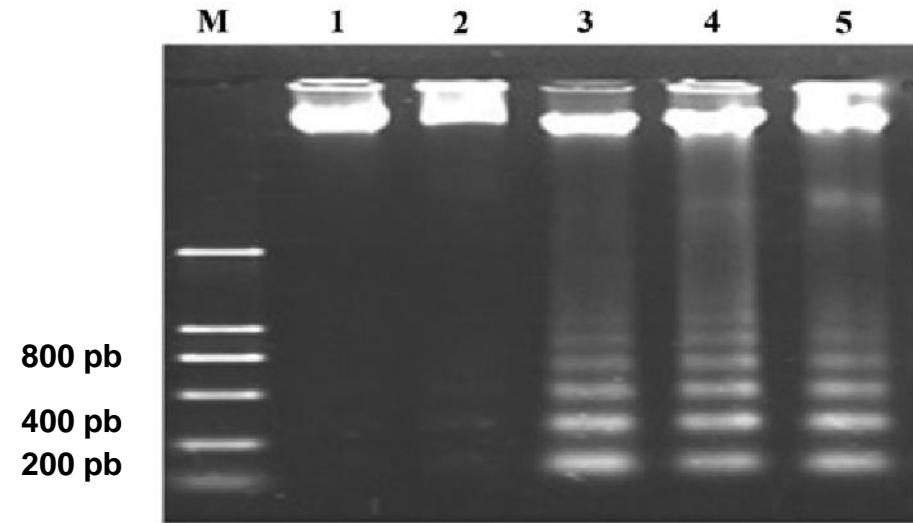
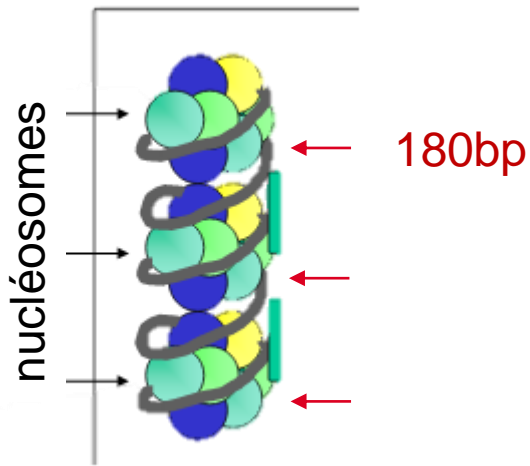


Chromatine condensée et
fragmentée

Immunofluorescence : Marquage cellules DAPI

Apoptose, mise en évidence de la fragmentation de l'ADN

- Coupure internucléosomiques par des endonucléases

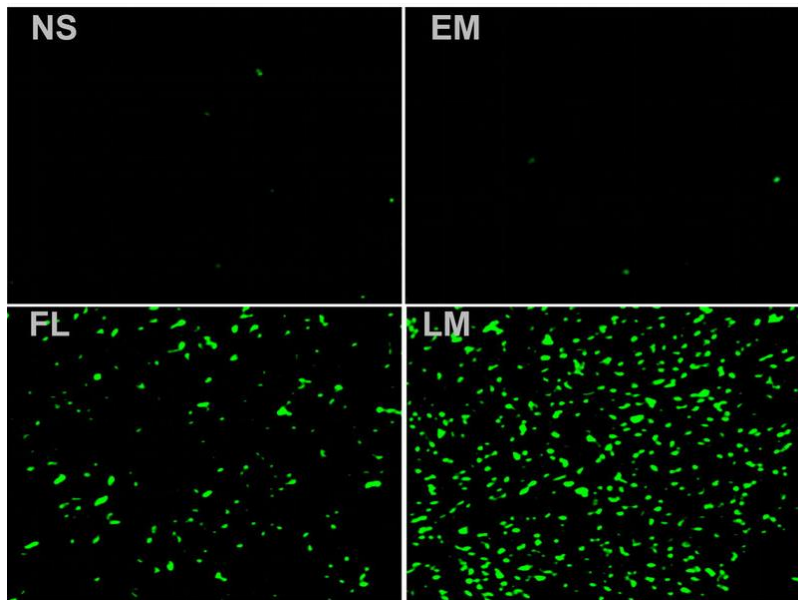


- Génère des fragments multiples de 180pb caractéristique sur électrophorèse sur gel d'agarose

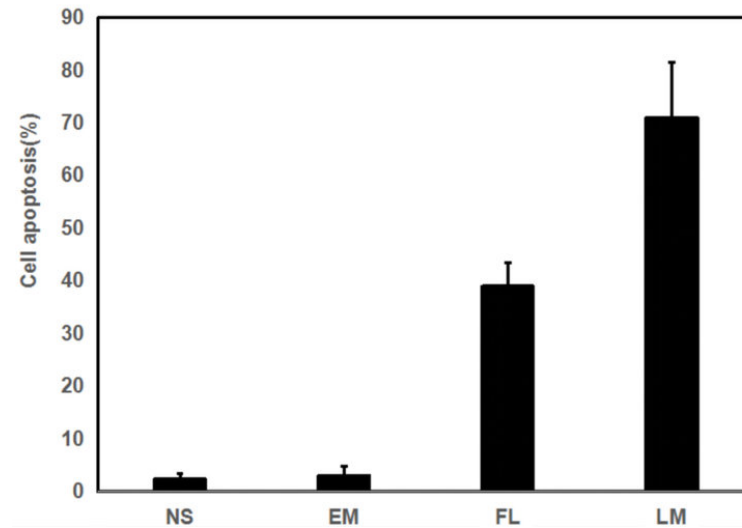
Apoptose, mise en évidence de la fragmentation de l'ADN

➤ Test tunel

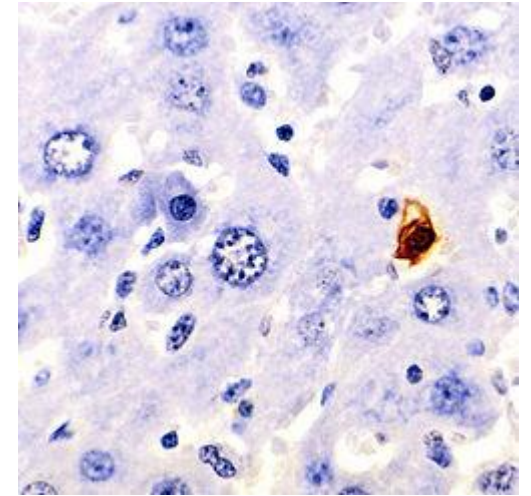
A



B

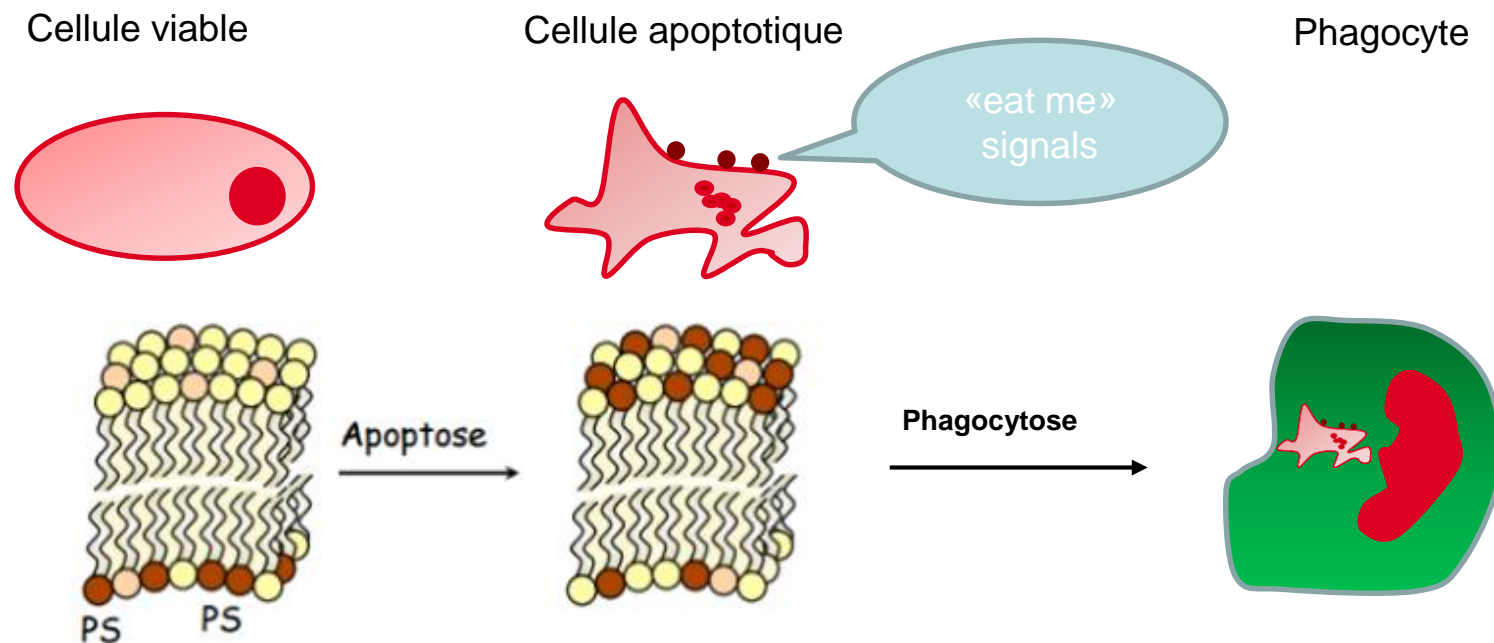


C



Apoptose, mise en évidence des modifications membranaires

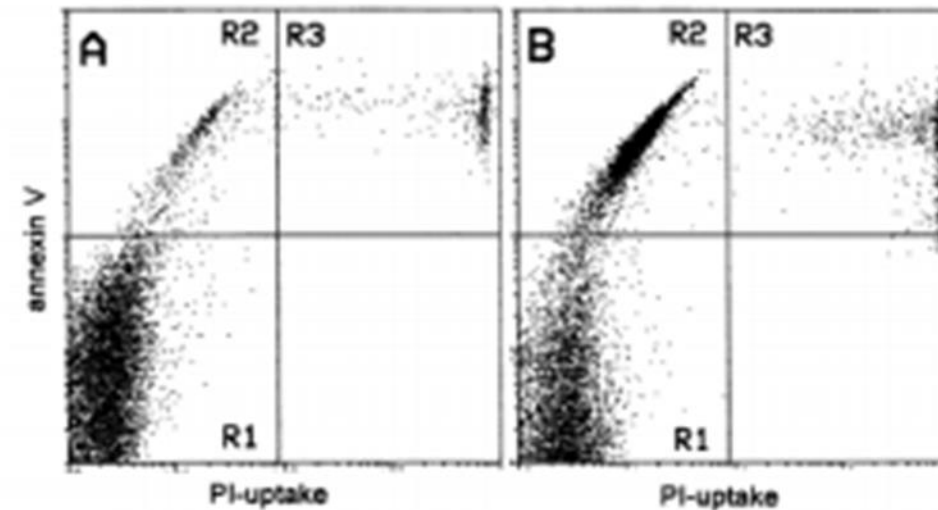
- Pas de troubles de la perméabilité de la membrane plasmique



- Externalisation des phosphatidylsérines : expositions des phosphatidylsérines sur le feuillet externe.

Apoptose, mise en évidence des modifications membranaires

➤ par cytométrie en flux

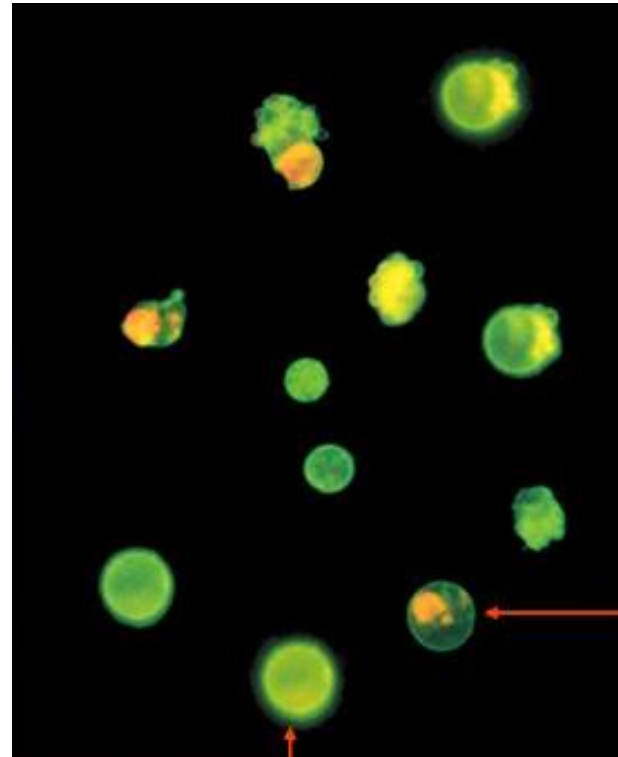


Analyse PI/Annexine V-FITC de cellules de thymocytes de rat

A : non traitées, B : traitées par dexaméthasone ; R1 : viables (-/-), R2 : apoptotiques (Annexine+/PI-), R3 : R3 : mortes, nécrotiques (+/+) [Van Engeland et al. 1998]

Apoptose, mise en évidence des modifications membranaires

➤ par immunofluorescence



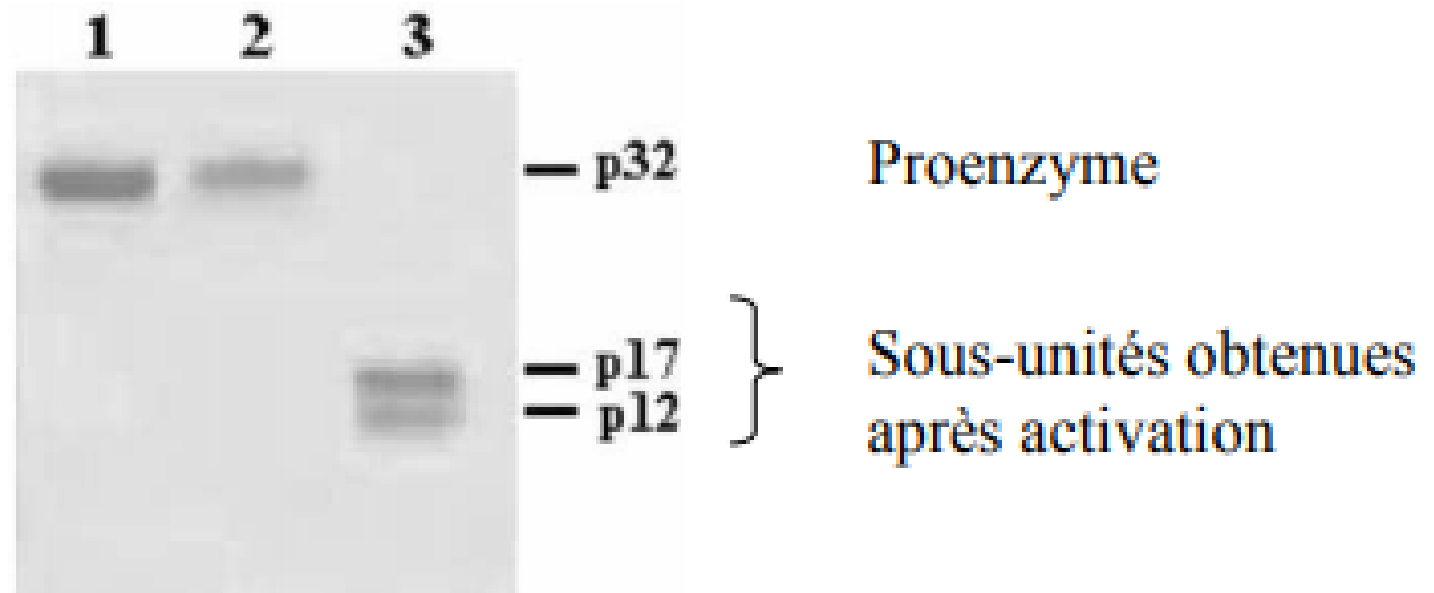
Marquage:

- Iodure Propidium (rouge)
- Annexine V (vert)

Nécrose

Apoptose

Apoptose, mise en évidence de l'activation des caspases par western-blot.



Western Blot : anticorps révélation anti caspase 3

Messages essentiels du cours

- Les mécanismes moléculaires de l'apoptose engagent deux voies majeures : La voie des récepteurs de morts et la voie mitochondriale.
- Ces deux voies sont régulées par deux acteurs majeurs : les caspases et la famille Bcl2.
- Il existe différentes techniques d'étude de l'apoptose qui reposent sur les caractéristiques morphologiques et moléculaires de celle-ci.

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 Grenoble Alpes (UGA).

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Grenoble Alpes (UGA), et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.