

Examen Terminal d'enzymologie 1 (B32)
Analyse des paramètres cinétiques et d'inhibiteurs de
caspases
Janvier 2015

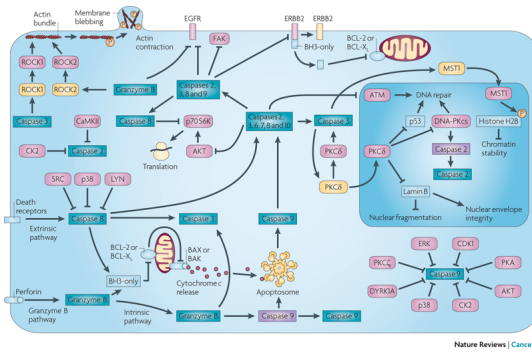
Consignes

Vous devez respecter les méthodes données en travaux dirigés. Vos graphiques doivent comporter toutes les données qui ont été exigées en TD. EXPLIQUEZ CE QUE VOUS FAITES !

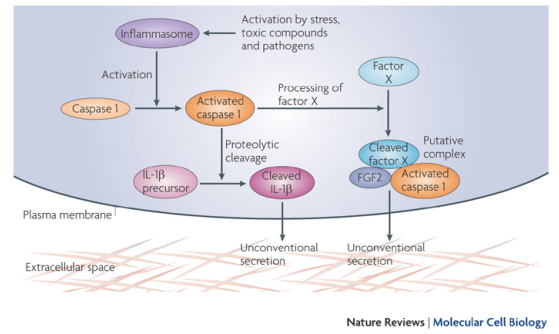
Rédaction : les abréviations de toute sorte sont interdites (-0,5 par abréviation). Vous devez faire des phrases : sujet/verbe/complément.

Equations de droites : Les données ici sont « parfaites », une vraie droite moyenne n'est pas exigée. Calculez vos équations de droite en n'utilisant que deux points pour la pente et un seul pour l'ordonnée à l'origine. Le r^2 de chacune de ces droites est 0,9999999.

Les caspases sont des protéases à cystéine impliquées à la fois dans la mise en place de l'apoptose (mort cellulaire programmée) et dans la production de certains médiateurs de l'inflammation. La caspase 1, par exemple, a été impliquée dans les étapes de production de l'Interleukine 1b alors que la caspase-3 est une des caspases initiatrices de l'apoptose. Ces enzymes activent ou inactivent des effecteurs par clivage. Elles sont elles-mêmes produites sous forme de zymogène inactif et s'activent soit par auto-clivage soit par clivage *via* une autre caspase.(1) Compte-tenu de leur similitude de fonctionnement, il a été possible de créer des substrats synthétiques pouvant être hydrolisés par les 11 caspases connues chez l'homme de façon à obtenir les paramètres cinétiques de ces enzymes et pouvoir faire des tests simples d'activité (1). L'obtention d'inhibiteurs de ces caspases permettrait de pouvoir réguler un certain nombre de phénomènes biologiques (2).



(a) Les caspases apoptotiques



(b) caspase et cytokine

FIGURE 1: Fonctions des caspases (3,4)

Partie I : Étude cinétique des caspases (1)

Basé sur le motif de reconnaissance optimal pour chaque enzyme, des substrats avec la structure générale Ac-XEED-AMC (X désignant n'importe quel résidus d'acide aminé, E glutamate et D aspartate) ont été utilisés pour développer des tests fluorimétriques en continu. Le clivage se fait après l'acide aspartique terminal libérant le produit AMC qui est alors fluorescent. La nature du résidu X dépend de la spécificité de chaque caspase. Pour la caspase 3, le peptide utilisé est Ac-DEVD-AMC (1).

Question 1 : Expliquez cette méthode de mesure de la vitesse initiale /1

Question 2 : Expliquez les deux méthodes mathématiques qui permettent de démontrer les équations de Mickaelis et Menten. /2

Question 3 : Définissez k_{cat} et K_M /2

Question 4 : Analysez les données cinétiques de l'enzyme (1). (/7)

	[Ac-DEVD-AMC] μM			
	10	25	50	100
V_0 $\mu M/s$	0,000042	0,00006	0,00007	0,000076

TABLE 1: Vitesses de modification du substrat synthétique Ac-DEVD-AMC en présence de $6.10^{-6} \mu M$ de caspase 3

Partie II : Étude de l'effet d'aldéhyde-peptides inhibiteurs sur les caspases(2)

Des peptides inhibiteurs ont été dessinés pour les caspases selon le modèle suivant : une séquence peptidique du type XEXD (X désignant n'importe quel résidus d'acide aminé, E glutamate et D aspartate) suivi d'une fonction aldéhyde empêchant la coupure du peptide après l'aspartate final (2).

Question 1 : A partir du graphique 2a, analysez l'effet de l'inhibiteur Ac-DEVD-CHO sur la caspase 3. (2) /6

Question 2 : Le tableau 2b montre les constantes d'inhibition sur différentes caspases pour différents inhibiteurs dont la séquence peptidique varie légèrement. Analysez ces résultats et compte-tenu du mécanisme déterminé précédemment, expliquez le classement des caspases en trois groupes. /3

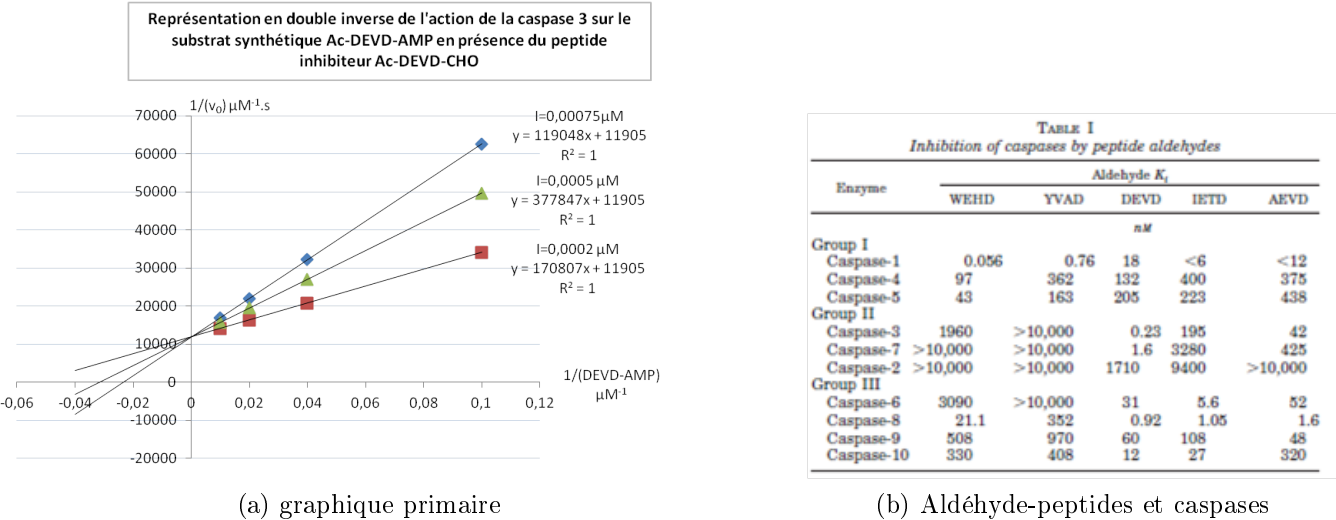


FIGURE 2: Effets des aldéhyde-peptides sur les caspases(2)

Référence :

(1)Margarita Garcia-Calvo*,1, Erin P. Peterson1, Dita M. Rasper2, John P. Vaillancourt2, Robert Zamboni2, Donald W. Nicholson2 and Nancy A. Thornberry1.(1999) *Purification and catalytic properties of human caspase family members* Cell Death and Differentiation 6, 362 369

(2)Margarita Garcia-Calvo, Erin P. Peterson,Barbara Leiting, Rejean Ruel, Donald W. Nicholson and Nancy A. Thornberry (1998)*Inhibition of human caspases by peptide-bases and macromolécular inhibitor*. J. Biol. Chem. , 273 :32608-32613.

(3)Carlos López-Otín Tony Hunter(April 2010) *The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer* Nature Reviews Cancer 10, 278-292

(4)Walter Nickel Catherine Rabouille (February 2009) *Mechanisms of regulated unconventional protein secretion* Nature Reviews Molecular Cell Biology 10, 148-155

