

Rôle de la Caspase-2 au cours des processus neurodégénératifs associés au vieillissement. Conception rationnelle d'inhibiteurs sélectifs et évaluation sur des modèles biologique

Elodie David-Bosc

► To cite this version:

Elodie David-Bosc. Rôle de la Caspase-2 au cours des processus neurodégénératifs associés au vieillissement. Conception rationnelle d'inhibiteurs sélectifs et évaluation sur des modèles biologique. Biochimie [q-bio.BM]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT: 2018SORUS173. tel-02457149

HAL Id: tel-02457149 https://theses.hal.science/tel-02457149

Submitted on 27 Jan2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Sciences de la Vie - Biochimie et Biologie Moléculaire École Doctorale ED-515 - Complexité du Vivant

> Présentée par M^{me} Elodie DAVID - BOSC

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR de SORBONNE UNIVERSITE**

Laboratoire d'accueil

Adaptation Biologique et Vieillissement (SU-CNRS UMR8256, INSERM ERL U1164) Équipe : Vieillissement Cellulaire Intégré et Inflammation Équipe : Stress Neuronal et Vieillissement 7 quai Saint Bernard Case 256, 75252 Paris Cedex 05

Rôle de la Caspase-2 au cours des processus neurodégénératifs associés au vieillissement

Conception rationnelle d'inhibiteurs sélectifs et évaluation sur des modèles biologiques

Présentée et soutenue publiquement le 26 Novembre 2018, devant le jury composé de :

M. Philippe Karoyan	Président
Professeur, Sorbonne Université	
Mme Joëlle Vidal	Rapporteur
Professeur, Université de Rennes	
M. Alain Buisson	Rapporteur
Directeur de Recherche, Grenoble Institut Neurosciences	
M. Daniel Gillet	Examinateur
Directeur de recherche, CEA Saclay	
M. Lorenzo Galluzzi	Examinateur
Assistant Professor, Weill Cornell Medical College	
Mme Chahrazade El Amri	Directrice de thèse
Professeur, Sorbonne Université	
M. Etienne Jacotot	Directeur de thèse
Directeur de Recherche, INSERM	

Comme Marie Curie, « Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées »

À Jérôme,

À maman, À papa,

À Mamie Yo, À papi Pierrot,

À papi Dédé

« Premier principe : ne jamais se laisser abattre par des personnes ou par des événements » Marie Curie

REMERCIEMENTS

Ces trois années ont été aussi enrichissantes sur le plan professionnel que personnel, puisque, oui, la thèse est avant tout une belle aventure humaine au cours de laquelle j'ai fait de merveilleuses rencontres. Aussi, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse en n'hésitant pas à adapter leurs emplois du temps pour permettre la constitution de ce jury. Aussi, je remercie vivement M. Philippe Karoyan d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie aussi sincèrement Mme Joëlle Vidal et M. Alain Buisson qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail en consacrant leur temps précieux à la lecture de ce manuscrit. Enfin, je remercie chaleureusement, M. Daniel Gillet et M. Lorenzo Galluzzi qui ont consenti à examiner ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, Chahrazade El Amri et Etienne Jacotot qui m'ont offert l'opportunité de réaliser ce travail de thèse. Etienne, merci de m'avoir fait partager ta passion débordante pour la Caspase-2, d'avoir su me faire confiance tout au long de cette thèse, et de m'avoir impliqué dans ce projet qui t'anime depuis 20 ans. Chahrazade, vous m'avez récupérée au berceau, comme vous dites souvent. Dès ma première année de Master vous avez su me transmettre votre passion pour l'enzymologie mécanistique des protéases, au travers de nombreux conseils et d'échanges scientifiques toujours ponctués de bonne humeur. Bienveillante et à l'écoute vous m'avez toujours soutenue et m'avez permis d'achever sereinement ces derniers moments de thèse, nous y sommes arrivées. « La vérité si je mens » Chahrazade, vous êtes une directrice au top, merci de m'avoir accordé votre confiance.

Je remercie ensuite M. Bertrand Friguet qui m'a accueillie au sein de son unité et de son équipe. Toujours à l'écoute et bienveillant, vous avez nettement contribué au bon déroulement de cette thèse. Je tiens également à remercier Mustapha, co-directeur de l'équipe. Mustapha, merci pour tous ces échanges qui m'ont permis de travailler plus sereinement sur les THP-1. Merci également de m'avoir associée à votre travail sur l'Arglabine. Je remercie également Bernard Brugg, pour nos échanges, ses conseils et sa bonne humeur. Ça été un plaisir de travailler dans votre équipe à Étienne et toi.

Je remercie aussi sincèrement les membres de mon comité de suivi de thèse, Mme Guianvarch, M. Belvindrah et M. Galluzzi qui m'ont accompagnée et encouragée pendant ces trois années de thèse. Je retiens tous les bons conseils que vous m'avez prodigués et qui me permettrons d'appréhender sereinement la suite de cette aventure.

Je remercie ensuite Dirk Stratmann, Jacques Chomellier, Jaysen, Maxime, Maud et Fabio, de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, pour ces échanges toujours enrichissants au cours desquels j'ai beaucoup appris sur la modélisation moléculaire.

Évidemment, je ne peux que remercier M. Christophe Piesse qui m'a initiée à la synthèse peptidique. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et tes moqueries multiples. Je les retiens !

Je remercie chaleureusement Michèle Reboud. Jamais avare de sourires et de très bons conseils, j'ai toujours admiré la passion qui vous animait lors de nos échanges riches en enzymologie. Ça été un réel plaisir de travailler avec vous. Merci également de m'avoir accordé votre confiance pour ce travail que nous avons mené, en équipe, sur le protéasome.

Je remercie vivement l'équipe d'Oxiprotéomics, Martin, Andréa, Anaïs. Merci de m'avoir permis de réaliser la toute dernière expérience de ma thèse. Merci également pour nos échanges, votre bonne humeur, et votre soutien. Je remercie aussi, la petite stagiaire Bordelaise, Inès, pour ces échanges agréables et son sourire.

Je remercie également Candice Botuha pour cet échange enrichissant sur la réactivité chimique.

Je souhaite également remercier l'équipe de spectrométrie de masse, Emmanuelle, Gilles, Lucrèce pour la super formation que j'ai suivie à leurs côtés. Merci pour vos sourires qui m'ont accompagnée jusqu'à la moitié de ma thèse, déménagement oblige.

Je remercie Philippe, Johanne, Aurélie, Najet et Florence. Malgré votre charge de travail vous avez toujours su m'accorder de votre temps pour m'aider dans toutes mes démarches. Merci aussi pour toutes nos petites conversations et surtout, pour vos sourires. Vous faites un travail incroyable, que je tiens à saluer.

Un grand merci aux membres de l'équipe d'Onnik Agbulut, Hélène, Alexandre, Pierre et Onnik bien évidemment qui m'ont permis d'utiliser leur microscope pour achever les travaux de ma fin de thèse. Je remercie aussi l'équipe Zhenlin pour leurs sourires et bonne humeur. Marie Thérèse, je crois que notre spot aura été ce couloir du A6, que de rires en ce lieu sacré ! Merci aussi pour ton soutien. Je te souhaite une très bonne fin de thèse, et je sais que ton travail colossal sera récompensé comme tu le mérites.

Un grand merci aussi à l'équipe enseignante, Nicole, Sandrine, Éric, Laetitia et aux collègues CME avec qui j'ai partagé de super moments. Sandrine Castella, finalement nous n'aurons pas produit notre enzyme, pourtant ce n'est pas faute d'avoir fait des tentatives. J'ai beaucoup apprécié tous nos échanges et surtout merci pour ton sourire, c'était un vrai plaisir de te croiser dans les couloirs à chaque fois.

Je remercie particulièrement Julie, Pauline, Philippe, Benjamin et Josquin qui m'ont formée à la microfluidique, à la culture de lignées cellulaires, à la quantification synaptiques, aux traitements pharmacologiques, aux IFs, Ça en fait pas mal finalement. J'ai adoré apprendre à vos côtés. Merci aussi pour votre soutien, et finalement même si tout le monde est parti je n'en retiens que le meilleur. Merci à vous. Je remercie également Jean-Michel, bien que nos échanges aient été limités, j'ai toujours apprécié nos conversations.

Je remercie aussi Gullen, que d'heures passées à la préparation des dispositifs microfluidiques. Merci aussi pour tes sourires et ta bonne humeur. Hugo, même si nous avons débuté sur de mauvaises bases, la suite de nos échanges s'est toujours avérée agréable. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également Coralie, qui a toujours géré la L1 d'une main de maître. Je remercie également Francesca, Lucie, Morgane pour leur gentillesse. Julia, je te remercie de nous avoir parlé du plugin de comptage sur ImageJ, ça s'est avéré plus qu'utile pour cette fin de thèse.

Isabelle, merci pour toutes ces discussions et tous les bons conseils que tu m'as toujours apportés. Nos échanges ont toujours été un réel plaisir. Aurore, merci également pour tes conseils, notamment pour la culture cellulaire. Merci aussi pour ces petits moments agréables passés en salle de culture

M. Duplus, tu as cru que j'allais m'arrêter à la partie sur l'enseignement je suis sûre... Je te remercie sincèrement pour toutes nos conversations, pour ton soutien tout au long de ma thèse et surtout merci pour tous les conseils que tu m'as donnés avec la gentillesse et la bienveillance qui te caractérisent.

Je tiens aussi à remercier Khadija, Vimala, Dominique pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Dominique, je n'oublie pas ce jour d'été 2017 où tu as réceptionné mes cellules avec qui j'avais eu tant de malchance, merci pour cette douceur qui te caractérise. Janek, merci pour toutes ces conversations passionnantes et parfois délirantes. J'admire la passion des sciences qui t'anime. Je te souhaite que le meilleur pour ton nouveau poste.

Je remercie aussi chaleureusement ma chère Monique et ma chère Claire, mesdames, vous faisiez partie des piliers du laboratoire, merci d'avoir rendu mon séjour à vos côtés tellement agréable. Vos petits conseils et attentions m'ont toujours beaucoup touchée. Merci aussi à toi Hilaire, ton sourire, ta bonne humeur et ta grande gentillesse m'ont fait passer de beaux moments dans les couloirs. J'espère que je vais pouvoir honorer comme il se doit la promesse que je t'ai faite en entrant en thèse.

Merci également aux stagiaires du laboratoire : Coline, Nesrine, Mia, Thomas, Lorraine, Maxime, et ma petite Laurie-Lou. Vous avez su, chacun à votre façon me faire perdre mes cheveux parfois (il se reconnaîtra), et surtout me faire vivre de bons moments.

Ma petite Marie Popo, on dit toujours de garder le meilleur pour la fin, donc comme tu pourras le constater tu n'es pas à la fin (haha). Merci pour toutes ces conversations, ces conseils, ces fous-rires, ces moments passés en culture, ces mesquineries que tu manies à la perfection.

Merci à toi aussi ma petite Rachel, pour ton soutien et ton sourire. Merci pour cette journée de formation WB ! Je pense que nous nous en souviendrons. Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite. Merci aussi à toi Rym, même si je n'ai pas eu pleinement le temps d'exercer à fond mes plaisanteries avec toi, j'ai toujours apprécié nos petites discussions. Même si je n'ai aucune inquiétude, je te souhaite un bon courage pour cette thèse que tu sauras mener à bien (la biblio, penses-y). Merci aussi à toi Yara, pour ta douceur et ton sourire.

Ma petite Fanny, ça y est, l'aventure touche à sa fin, nous avons presque réussi. Je te remercie pour ton soutien tout au long de la thèse et plus particulièrement pendant la rédaction. C'est avec beaucoup d'admiration que je regarde ce gros travail de thèse que tu as accompli. Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite.

Kadiatou, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tes « Coucou c'est moi ». Tu as été le petit soleil de ma thèse. J'aimerai tant t'emmener avec moi pour la suite...

Je remercie aussi Maryse, Julietta et Josette pour leurs sourires et leur gentillesse.

Je le dis souvent, mais vous, l'équipe « Friguet » : Chahrazade, Isabelle, Bertrand, Mustapha, Aurore, Éric, Marie Popo, Sabrina, Valérie, Hilaire, Fanny, Rachel, Rym, Dominique, Vimala, Khadija, Michel, Kadiatou mais aussi les « anciens », Monique, Claire, Janek, Audrey, Sofia, vous êtes ma « seconde famille laboratoire ». Vous avez tous contribué au fait que je puisse rendre avec fierté ce manuscrit. Par vos multiples conseils et attentions, vous avez été d'un réel soutien. Merci à vous.

Je remercie aussi toutes les personnes dont je ne me souviens pas le nom mais qui par leur sourire ont illuminé certaine de mes journées. Je m'excuse aussi pour les personnes que j'ai oubliées. Si ce n'est pas fait sur le papier, j'ai déjà dû vous remercier de vive voix.

Tata Valou, merci pour toutes ces conversations tellement agréables et bien souvent mythiques que nous avons partagées. Tu as su tout au long de ma thèse m'apporter ton soutien pour m'aider à franchir les obstacles qui se présentaient. Toujours aux petits soins avec moi, tu m'as soutenu jusqu'au bout et pour tout cela je te remercie.

Ma Ségo, qui aurait cru qu'au détour d'une dissection de souris Swiss au stade de gestation E16, je rencontrerais une si belle personne. Merci pour tout, ton soutien, les fous-rires, les bêtises faites ensembles, tes conseils et surtout merci pour ton énergie débordante que j'apprécie tellement.

Ma Sahsah, ma Brousse, mon cHaton, que dire ? (à part tu que tu es rousse, haha). Tu es une superbe personne, juste, merci pour tout. Ton soutien inconditionnel, les fous-rires à répétitions, nos conversations toujours dans un langage soutenu, les épopées Distrib où nous « sélectionnions le produit souhaité », ta gentillesse, ta douceur et ta bienveillance. Tout ça, m'a permis de me battre, d'achever ma thèse en merveilleuse compagnie et de rendre ce manuscrit. Tu es, sans aucun doute, l'une des plus belles rencontres de l'aventure, et si un chapitre se clôt au laboratoire, un nouveau s'ouvre sur la suite. Je ne te lâche pas. Et je sais que ta rigueur, tes talents de neurobiologistes et les compétences indéniables que tu as développées en Enzymo (tu as maîtrisé tellement vite d'ailleurs !) te feront mener à bien cette thèse, j'ai parfaitement confiance et « foie » en toi.

Ma Fifi, bien souvent au cours de la thèse je ne savais pas si je devais te secouer en te demandant « mais pourquoiiiiiiii? » ou alors te remercier. Aujourd'hui maintenant que l'aventure touche à sa fin, je ne peux que te remercier. Merci d'avoir largement contribué au fait que je me sois orientée vers le chemin périlleux de la thèse. J'ai trouvé en toi un mentor,

mais surtout une merveilleuse amie, qui a toujours su me soutenir, me conseiller, m'aider à retrouver la motivation bien souvent. Merci pour tout ce que j'ai appris à tes côtés, tu as fait de moi une accro à l'enzymo ! J'ai beaucoup d'admiration pour toi et pour le travail que tu as accompli, tu as été un vrai modèle au cours de cette thèse. Évidemment je te remercie aussi pour nos énormes fous-rires, les moments « dancing », les moments de panique et de « trouille » en fermant le laboratoire. Finalement au cours de la thèse, j'ai perdu des cheveux, des neurones mais surtout j'ai gagné une amie formidable. (Maintenant, place à la raclette !)

Je remercie aussi ma Tomin qui m'a suivie une partie de ma thèse. Merci à ma Molly et mon Sammy qui sont mes petits soutiens du quotidien.

Papi dédé, j'ai cru avec la plus grande naïveté qu'en travaillant sur un sujet qui s'approchait du mal qui t'éloignait de nous, j'arriverais à comprendre. Aujourd'hui il est trop tard, alors je te remercie pour toutes les belles images que je garde en mémoire et que nous avons construites ensemble, autour des repas partagés, de ton impatience, sifflotant face à mes retards du matin et nos trajets vers le lycée où l'on écoutait la radio. Merci d'avoir été cette personne exceptionnelle.

Mamie Yo, merci d'avoir cru en moi jusqu'au bout. Merci aussi pour tous ces coups de fil du dimanche qui m'ont à chaque fois donné le sourire et le courage. J'admire ton énergie et ta force, elles ont été une vraie inspiration pour me permettre d'achever ce travail. Je regrette tellement que papi n'ait pas pu voir ça, il est l'une des principales motivations qui m'ont permis de poursuivre mes études. J'espère de tout cœur le rendre fier.

Maman, Papa, je vous remercie tellement. Vous avez été d'un soutien inconditionnel, toujours là pour me soutenir et croire en moi, c'est grâce à vous que je termine ma thèse. J'espère de tout cœur vous rendre fiers. Ces remerciements ne seront jamais à la hauteur de tout ce que vous avez fait pour moi évidemment, mais vous savez aussi tout ce que ça représente.

Mon Jérôme, c'est avec tellement d'émotion que je t'adresse mes remerciements. Toi, mon pilier du quotidien, mon mari, le futur papa de ce petit être, mon tout. Sans toi je ne serais jamais arrivée là où j'en suis. Tu m'as toujours encouragée à aller plus loin, à me battre, à tout donner pour arriver à mes fins. Tu es incontestablement ma plus grande motivation et aussi ma plus belle inspiration. Merci d'avoir facilité grandement mes traitements de datas, sans tes macros, je serai sans doute toujours en train de recopier mes valeurs à partir de feuilles (;)). Merci pour tout, ton soutien sans faille, ton énorme patience, tes encouragements, ta sagesse, ta grande gentillesse. Ce manuscrit, je te le dédie.

Une page se tourne bientôt, et c'est avec beaucoup d'émotion que je me tourne vers l'avenir, chacun à votre façon vous avez contribué à la rédaction de ce manuscrit et pour cela je vous remercie tous, sincèrement.

(Finalement, même (*spoiler alert* !) pour les remerciements je n'arrive pas à faire court... Heureusement on n'a pas atteint les 15 pages, n'est-ce pas Chahrazade ? (haha))

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	19
INTRODUCTION	22
I. « Alice in Caspase Land »	22
A. Préambule	22
1. Protéases : Nomenclature	22
2. Clan CD, Famille C14 : Les Caspases	24
3. Famille C14 : Phylogénie	25
4. C14A : Classification par fonctions biologiques	27
B. Biochimie des Caspases	
1. Base moléculaire de l'activation des Caspases	
1.1. Organisation structurale.	
1.2. Pro-Caspases monomériques et plateformes d'activation	
1.3. Activation des Caspases exécutrices	42
1.4. Activation de la Caspase-14	45
1.5. Activation des caspases initiatrices par des agents cosmotropiques in vitro	46
2. Mécanismes catalytiques des Caspases : Catalyse et spécificité	47
2.1. Structure et Organisation générale	48
2.2. Architecture du site actif	49
2.3. Spécificité de substrat	53
2.4. Mécanisme catalytique	55
II. Les Caspases, Rôles biologiques	
A. Caspases : Régulateurs majeurs de l'Apoptose et de l'inflammation	58
1. Les différents types de mort cellulaires	58
2. Caspases et Apoptose	58
2.1. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale	
2.2. Voie extrinsèque : Caspases-8 et -10	
3. Caspases et Inflammation	63
3.1. Les Caspases-1, -4, -5 et -11 : acteurs clès de l'immunité innée	
B. Regulation de l'activité Caspase	
1. Regulation de l'activité des Caspases apoptotiques	
1.1. Regulation post-traductionnelles.	6/
1.2. Regulation par Interactions proteines/proteines	
2. Regulation des Caspases innammatoires	
C. « when dying is not the end »	
1. Caspase et differenciation cellulaire	
1.1. Cas des cellules anucléés.	
 Caspases : prolifération et régénération tissulaire 	
2. Caspases : promeration et regeneration tissulaire	
5. Caspases et proprietes des cendies souches embryonnaires et prompotentes induites	00
D. Caspases et systeme nerveux central	00
Organisation generale du système nerveux central	80
2. Physiologie	82
2.1. Activation des Caspases au cours du développement neuronal	82
2.2. Caspases et neurogenese	 22
3 Fonctions des Casnases dans les maladies neurodégénératives	05 Q1
3.1 Rôles dans les nathologies aigues - Ischémie	ده ده
3.2. Rôles dans les pathologies chroniques	92 Q2
III. La Caspase-2 : « The Cinderella Caspase »	105
A Généralités sur la Casnase-2	105
	105

	1. Historique	105
	2. Structure et régulation du gène CASP-2	105
	3. Localisation tissulaire et subcellulaire	. 107
B	Biochimie de la Caspase-2	109
5.	1 Activation	109
	1.1 Activation par dimérication	100
	1.2 Plateforme d'activation	110
	2. Structure of Catalyse	115
	2. Structure et Catalyse	115
	2.1. Organisation generale	115
	2.2. Structure	117
	3 Substrats andogànas	110
c	Company 2 : Pôlos Diologiques	120
C.	Caspase -2 . Roles Biologiques	120
	1. Souris constitutivement deficientes en Caspase-2	120
	2. Caspase-2, son role dans les processus apoptotiques	121
	3. La Caspase-2 comme suppresseur de tumeur ?	122
	3.1. Des preuves issues des modèles animaux	122
	3.2. Généralités sur la régulation du cycle cellulaire	122
	3.3. Mécanismes possibles de la suppression de tumeur par Caspase-2	123
	4. Caspase-2 et inflammation	126
	5. Caspase-2 et Stress oxydant	128
	5.1. Phénotypes des souris CASP-2 ^{-/-}	128
	5.2. Le stress oxydant induit une apoptose Caspase-2 dépendante	129
	5.3. Caspase-2 et homéostasie osseuse en condition de stress oxydant	129
	5.4. Répression de l'autophagie	130
	6. Caspase-2 et Métabolisme	131
	7. Caspase-2 et Vision	132
	8. Régulation de l'activité Caspase-2	. 133
	8.1. Régulation de l'expression du gène CASP-2	133
	8.2. Régulation post-traductionnelles	134
	8.3. Régulation de la formation du PIDDosome par BubR1	135
IV. La	a Caspase-2 dans le système nerveux central	138
Α.	Rôle de la Caspase-2 dans des modèles de stress neuronaux	. 138
	1. Hypoxie / ischémie néonatale	. 138
	2. Caspase-2 et Excitotoxicité	. 139
	3. Carence en sérum ou en facteurs de croissance neuronaux	. 140
	4 Mitochondrie stress oxydant et Casnase-2	141
R	4. Mitochonane, stress oxydant et euspase 2	1/12
υ.	$1 Ave \theta = a muleïde$	117
	1. Axe p-diffyiolde	142
	1.1. Caspase-2 : Mediateur de la synpatotoxicite induite par Ap ?	142
	1.2. Mediateur de la toxicite induite par Ap	145
	2. Caspase-2 et rau	. 146
-	3. Enjeux	147
C.	Stratégies thérapeutiques actuelles pour la maladie d'Alzheimer	148
	1. Cibler A β sous toutes ses formes	149
	2. Agrégation de Tau	149
	3. Récepteurs du SNC	150
	4. Autres stratégies	. 150
V. In	hibiteurs synthétiques de Caspases, La sélectivité : un réel enjeu	152
A.	Généralités sur les inhibiteurs de protéases	. 152
B	Inhibiteurs de Caspases.	. 153
5.	1 Stratégies	152
	1.1. Inhibiteurs du site actif ou orthostériques	

1.2. Inhibiteurs allostériques	161
2. Sondes d'activités Caspases	. 163
C. Inhibiteurs de Caspases : Outils pour la recherche et pour le développement clinique	. 165
1. Inhibiteurs en tant qu'outils	. 165
2. Inhibiteurs de Caspases en essais cliniques	. 165
D. Vers des inhibiteurs sélectifs de la Caspase-2 ?	. 168
1. Inhibiteurs irréversibles sélectifs du groupe II	. 168
2. Optimisation	. 168
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	171
MATERIELS ET METHODES	175
L Enzymologie mécanistique	175
Δ Matériels	175
1 Enzymes recombinantes et substrats fluorogènes	175
 2 Molácules átudiáes au cours de la thàse 	176
2. Autros réactifs	177
A Appareila	177
R. Cinétique enzymatique	177
 Cinetique enzymatique Conditions ovnérimentales 	177
Conditions experimentales Détermination de l'IC	170
2. Determination de l'Ic ₅₀	100
 Etude du mecanisme a minipition	100
Reversionne de l'ener innonceur par la methode de dilution	100
2. Inhibitours souelents	101
3. 1. Mice en évidence	104
3.2 Quantification des paramètres cinétiques	104 184
II Évaluation des inhibiteurs sur des modèles cellulaires d'anontose et d'inflammation	187
A Modèle cellulaire standardisé d'anontose	187
1. Culture des cellules Hella	187
2 Drincing	107
2. Traitement et Conditions de marquage	188
4. Quantification des effets cellulaires	100
 Qualitification des effets central es P. Modèle inflammateire 	100
 Modele Initialinitatolite Cultures des lignées THD 1 	100
Cultures des lightees THP-1	100
2. Étude de l'inflammation et de la mart collulaire	100
3. Etude de l'imidminiation et de la mort cenulaire	101
III. Etude du civage de la proteine rad numaine recombinante	102
A Dispositife misrofluidiques	102
A. Disposition for modèles utilisés	102
Fresentation des nuces microfluidiques	102
 Pablication des puces micronologies Pablication des puces micronologies 	104
 D. Cultures de neurones printailes 1. Dissoction at régunération des neurones 	104
Dissection et recuperation des neurones Dissection et recuperation des neurones	194
2. Ensementement et entretien des cultures	105
 traitements pharmacologiques	105
1. Preparation des oligomeres d'Ap	192
 Selection des circuits et traitements pharmacologiques 	196
D. Etude de la perte synaptique	197
1. Immunocytochimie	197
2. Microscopie a fluorescence	199
3. Quantification de la perte synaptique	199
E. Analyses statistiques	. 200

V.	Étude de la cytotoxicité des inhibiteurs sur des cultures primaires de neurones corticaux	201
Re	SULTATS PARTIE 1	203
Ι.	Considérations générales sur les propriétés enzymologiques de la Caspase-2	203
П.	Inhibiteurs généraux de Caspases	205
	A. Peptides aldéhydes – Inhibiteurs réversibles de première génération	206
	1. Pouvoir inhibiteur et mécanisme d'action	206
	2. Quantification du pouvoir inhibiteur	207
	B. Inhibiteurs irréversibles de seconde et troisième génération	210
	1. Présentation des molécules et hiérarchisation de l'effet	210
	2. Mécanismes d'action des composés	211
	3. Quantification des paramètres cinétiques	213
	4. Etude de l'effet des inhibiteurs sur un modèle d'apoptose dépendant de la Caspase-2	216
	4.1. Presentation du modele HeLa - Vincristine	216
	5. Cytotoxicité des composés sur des neurones corticaux primaires	217
	C Effets croisés des inhibiteurs des premières générations sur les Cathensines	218
Ш	Inhibiteurs sélectifs des Caspases du groupe II	221
	A. Présentation de la série	221
	B. Hiérarchisation de l'effet au vu des valeurs IC ₅₀	222
	C. Quantification des paramètres cinétiques de l'inhibition et efficacité des composés	223
	D. Efficacité des molécules dans le modèle d'apoptose	225
	E. Cytotoxicité sur des cultures primaires de neurones du Cortex	226
IV	En route vers la sélectivité	226
	A. Contexte	226
	B. Présentation des composés	227
	C. Hiérarchisation de l'effet et mécanisme d'action	228
	D. Type d'inhibition et quantification des paramètres cinétiques	229
	E. Effet des molécules dans un contexte cellulaire	231
	F. Évaluation de la toxicité de h33 sur culture primaire de neurones corticaux	232
V.	Un long chemin vers la sélectivité	233
	A. Premiers pas vers la sélectivité avec LJ2	234
	1. Structure et quantification des premiers effets sur les Caspases-2 et -3	234
	2. Quantification des paramètres cinétiques	234
	3. Evaluation du LJ2 dans le modele d'apoptose	230
	B. Peptides inhibiteurs stereospecifiques reversibles Présentation des molégules	237
	Fresentation des molecules Étudos mécanistiques	257
	 C. Dentides Inhibiteurs stáráosnácifiques irráversibles 	257
	1 Présentation des molécules	239
	2 Hiérarchisation de l'effet grâce aux données ICro	240
	3. Efficacités inhibitrices des composés Ll2a Ll2b Ll3a et Ll3b	. 240
	D. Sélectivité vis-à-vis des protéases concurrentes	242
R		2/6
		240
١.	Pathogénicité du peptide β -amyloide	246
	A. Preampule	246
	 Dennées préalablement obtenues au laboratoire 	247 217
	Domnees prealablement obtenues au laboratoire Effot cupantoprotoctour de la CASE 2 cur des pourones de l'Ulimpesames	247 240
	2. Effet synaptoprotecteur de L12 dans un modèle <i>in vitre</i> de la maladie d'Alzheimer	∠4ð 2⊑0
П	Tail et Caspase-2	230 252
	A. Reconnaissance de la séquence de clivage sur Tau nar la Casnase-2	. 252

B. Clivage de Tau et Caspase-2	. 253
III. Caspase-2 et Inflammation	. 254
A. Mise en place du modèle	. 254
B. Optimisation des conditions de traitement	. 255
C. Évaluation des inhibiteurs LJ2 et Δ 2Me-TRP601	. 256
RESULTATS PARTIE 3	259
I. Préambule	. 259
II. Inhibiteurs de l'interface de dimérisation	. 259
A. Design de peptides ciblant l'interface de dimérisation de la Caspase-3	. 260
B. Conception d'un pentapeptide cyclique ciblant l'interface de dimérisation de la Caspase-2	. 263
III. Stratégie petites molécules	. 264
A. Résultats du criblage obtenus sur les dérivés Triazoles et Quinazolines.	. 265
B. Resultats du cribiage aleatoire	. 266
C. Cribiage des Anti-Inflammatoires non steroidiens	. 267
D. Les coumarines, innibent faiblement l'activité Caspase-2 in vitro	. 268
RESULTATS PARTIE 4	271
I. Modulation de l'activité de la kallicréine 6, la protéase à sérine la plus abondante du système ner	rveux
central	. 271
II. Identification de l'immunoprotéasome comme cible du composé pro-oxydant bien conn	u, la
Piperlongumine	. 272
DISCUSSION	277
I. Propriétés enzymologiques de la Caspase-2	. 277
II. L'efficacité vs la sélectivité	. 278
A. Peptides aldéhydes comme inhibiteurs de la Caspase-2	. 278
B. Peptides dérivés de cétones : halométhyl-cétone et acyloxyméthyl-cétone	. 279
C. Mécanisme d'action des inhibiteurs irréversibles de Caspases	. 282
III. Inhibiteurs aux motifs VDVAD : Efficacité sans sélectivité	. 283
IV. Effet des variations en P2 du motif VDVAD sur la sélectivité	. 285
V. Nouvelle série « LJ » : quand efficacité rime avec sélectivité	. 286
A. LJ4a et LJ5a - Aldehyde remplace : efficacité et selectivité diminuées	. 287
B. LJ2a et LJ3a	. 288
VI. Nodele cellulaire d'apoptose	. 289
A La Caspase-2 et son implication potentiene dans la maladie d'Alzheimer	291
A. La Caspase-2 previent de la perte synaptique induite par les ongomeres Ap ₁₋₄₂	291
B. Caspase-2 et clivage de l'au	294
C. Initialitation et maladie d'Alzheimer, un role pour la Caspase-2 :	. 290
IX Positionnement des composés L12a et L13a pour un développement clinique	297
	302
	207
PERSPECTIVES A COURTET MOYEN TERMES	307
BIBLIOGRAPHIE	310

TABLE DES FIGURES

Figure 1.	Topologies des interactions protéase-peptide substrat.	23
Figure 2.	Distribution phylogénétique des Caspases	27
Figure 3.	Classification des Caspases par fonctions biologiques	28
Figure 4.	Modèle d'activation des Caspase initiatrices -8 et -9.	32
Figure 5.	Assemblage du DISC, plateforme d'activation des Caspases-8 et -10.	35
Figure 6.	Formation de l'Apoptosome.	38
Figure 7.	Organisation en domaines des acteurs de l'inflammasome.	40
Figure 8.	Mécanisme proposé pour l'activation de la CASP-1 au sein des inflammasomes AIM2 et NLRP3	42
Figure 9.	Mécanisme d'activation de la pro-Caspase-7 humaine.	45
Figure 10.	Alignement de séquence des pro-caspases 14 connues	46
Figure 11.	Structure générale et alignement de séquences des Caspases humaines	49
Figure 12.	Topologies du site actif des caspases humaines.	53
Figure 13.	Spécificité de substrat des Caspases humaines	55
Figure 14.	Mécanisme catalytique des Caspases	57
Figure 15.	Modèle proposé pour l'activation de BAX	60
Figure 16.	Exécution de l'apoptose par l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose	61
Figure 17.	La CASP-1 est le médiateur central de la voie canonique de l'inflammasome	67
Figure 18.	Inhibition des Caspases-3, -7 et -9 par XIAP	71
Figure 19.	Mécanisme d'action de l'inhibiteur naturel p35 sur la CASP-8.	73
Figure 20.	Les différentes cellules du système nerveux central.	82
Figure 21.	Illustration du rôle des Caspases 3, -6 et -9 dans le pruning axonal	85
Figure 22.	Rôle des Caspases-3, -8 et -9 dans la physiologie du neurone	87
Figure 23.	Rôle de la CASP-3 dans la dépression à long terme (LTD)	90
Figure 24.	Régulation des activité Caspases dans les neurones.	91
Figure 25.	Marqueurs de la Maladie d'Alzheimer.	98
Figure 26.	Stades de dépots des enchevetrement de neurofibrilles et de plagues amyloides	99
Figure 27.	Sites de clivages putatifs des Caspases sur la protéine précurseur amyloïde	101
Figure 28.	Mécanisme d'action des Caspases proposé dans la maladie d'Alzheimer	104
Figure 29.	Génèse des isoformes de Caspase-2S et 2L.	107
Figure 30.	Modèle proposé pour l'activation de CASP-2.	110
Figure 31.	Modèle de maturation de PIDD 1	111
Figure 32.	Organisation du PIDDosome.	113
Figure 33.	Modèle suggéré pour l'initiation de la catalyse pour CASP-2.	117
Figure 34.	Les fonctions de la Caspase-2 dans la mort cellulaire	126
Figure 35.	Le stress du réticulum suite à une infection par RB51	128
Figure 36	Connexion entre la machinerie de checkpoint mitotique et l'activation du PIDDosome	137
Figure 37.	Inhibition génétique de CASP-2 dans un modèle d'ischémie néonatale	139
Figure 38	Modèle de l'activation de CASP-2 dans des modèles de stress neuronaux	142
Figure 39	Régulation de la morphologie de la synapse par la signalisation Rho GTPase	144
Figure 40	La perte synantique chez les animaux 120/KO CASP-2	145
Figure 41	CASP-2 clive Tau, nour libérer un fragment N-ter ATau314 et C-ter TCP35	147
Figure 12	Stratégie théraneutiques actuelles nour le dévelonnement de médicaments	1/Q
Figure /3	Organisation et mécanisme d'action des inhibiteurs pentidiques de Caspases	155
Figure 44.	Structure du O-VD-OPh	157
Figure 44.	Structure das pontidomimátiques inhibitours de Caspasos en ossai clinique	150
Figure 45.	Scaffolds chimiques des inhibitours organiques de Caspases en essai clinique	150
Figure 40.	Inhibition sélective de la CASP-2 nar DARnin	162
Figure 47.	Organisation générale « type » des condes d'activités	167
Figure 40.	Détermination des paramètres sinétiques par la méthode discontinue	104 105
Figuro 50	Détermination des paramètres cinétiques par la méthode continue.	102 196
Figure 50.	Determination des parametres uneurques par la methode continue.	100 102
Figure 51.	Representation des dispositios microfluidiques das nuess microfluidiques.	104
Figure 52.	Conditions do traitements	107
Figure 53.	Ontimication des conditions avnérimentales neur l'étude des estivités CASE 2 et 2	70L 731
rigure 54.	optimisation des conditions experimentales pour l'étude des activités CASP-2 et -3	205

Figure 55.	Structures des peptides aldéhyde de première génération conçus pour inhiber les CASP-2 et -3.	206
Figure 56.	Mécanisme d'action des peptides aldéhydes	.207
Figure 57.	Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO, inhibiteurs réversibles compétitifs des CASP-2 et -3	.209
Figure 58.	Inhibiteur de seconde et troisième génération	.211
Figure 59.	Mécanismes d'action des peptides inhibiteurs généraux de Caspases	.213
Figure 60.	Les inhibiteurs généraux sont des inactivateurs non sélectifs des CASP-2 et -3	.215
Figure 61.	Protection de la mort cellulaire par les inhibiteurs généraux de Caspases	.217
Figure 62.	Evaluation de la toxicité des composés z-VAD(OMe)-fmk et Q-VD-OPh	.218
Figure 63.	Effet inhibiteur des inhibiteurs de première génération sur les cathepsines	.221
Figure 64.	Structure des peptides inhibiteurs sélectifs des Caspases du Groupe II	.222
Figure 65.	Récapitulatif des valeurs IC ₅₀ des composés sélectifs du groupe II.	.223
Figure 66.	Cinétiques d'inactivation des CASP-2 et -3 par les inhibiteurs des Caspases du groupes II	.225
Figure 67.	Les composés TRP601 et son métabolite déméthylé protégent de la mort cellulaire	.226
Figure 68.	Evaluation de la toxicité du composé Δ 2Me-TRP601 sur cultures de neurones primaires	.226
Figure 69.	Conception rationnelle des composés c33, k33, h33, q33	.227
Figure 70.	Structure des composés c33, k33, h33, q33	.228
Figure 71.	Les composés c33, k33, h33 et q33 inhibent de manière réversible et efficace la CASP-2	.229
Figure 72.	Les inhibiteurs h33 et q33 sont des inhibiteurs réversibles compétitifs efficaces des CASP-2	.231
Figure 73.	Les composés h33 et q33 protégent de la mort celullaire dans le modèle HeLa	.232
Figure 74.	Le composé h33 ne présente aucune toxicité sur les cultures de neurones primaires	.233
Figure 75.	Structure et évaluation du profil d'inhibition des CASP-2 et -3 par le composé LJ2	.234
Figure 76.	Le composé LJ2 est très puissant inactivateur de la CASP-2	.235
Figure 77.	Effet du composé LJ2 dans le modèle d'apoptose	.236
Figure 78.	Structures des stéréoisomères LJ4 a et B et LJ5 a et b.	.237
Figure 79.	Les composé LJ4a et LJ5a sont des inhibiteurs réversibles compétitifs efficaces	.239
Figure 80.	Structures des composés irréversibles LJ2a et b et LJ3a et b	.240
Figure 81.	Quantification de l'effet inhibiteur de la nouvelle série d'inhibiteurs stéréospécifiques	.241
Figure 82.	Les composés LJ2a et LJ3a sont de puissants inactivateurs de la CASP-2	.242
Figure 83.	Etude de la sélectivité de la nouvelle série de composés.	.244
Figure 84.	Rôle synaptoprotecteur de CASP-2	.248
Figure 85.	Effet du composé LJ2 sur la perte synaptique	.249
Figure 86.	Effets des composés LJ2a et LJ3a à prévenir de la perte synaptique	.250
Figure 87.	Le composé LJ2 à 30 μ M prévient de la perte synaptique	.251
Figure 88.	Evaluation de la reconnaissance de la séquence de clivage par la Caspase-2.	.252
Figure 89.	Clivage de Tau par les CASP-2 et -3	.254
Figure 90.	Cinétique et dose réponses de la nigricine sur les cultures THP-1	.256
Figure 91.	Les molécules LJ2 et Δ 2Me-TRP601 préviennent de la libération massive d'IL-1 β	.257
Figure 92.	Structure de l'interface de dimérisation des Caspase-2 et 3.	.260
Figure 93.	Stratégie <i>in silico</i> utilisée pour la conception de peptide cycliques de l'interface de dimérisation	.261
Figure 94.	Effet de CIVSML et DFLYAYS sur l'activité CASP-3	.261
Figure 95.	La nouvelle stratégie basée sur un motif $\beta \alpha \beta$.262
Figure 96.	Le peptide cyclique GGWGQ conçu <i>in silico</i>	.264
Figure 97.	Scattolds des petites molecules organiques testees au cours de la trese	.265
Figure 98.	Profil d'inhibition par les composes i riazoles et Quinazolines des CASP-2 et CASP-3 a 50 µM	.266
Figure 100	Cripiage aleatoire des activites CASP-2 ou -3.	.26/
Figure 100.	Efficacité de 9 anti-inflammatoires non steroidiens à inniber les Caspases -1, -3, -4, -5 et -9	.268
Figure 101.	Trois derives coumarines innibent faiblement l'activité CASP-2 in vitro.	.269
Figure 102.	Structure au proteasome 265.	.2/3
rigure 103.	Prom a influence la Piperongumine sur l'activite Chi-L de l'immunoproteasome	.275

ABREVIATIONS

Ac :	Acétyle
AD :	Alzheimer's disease
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFC :	Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AMC :	7-amino-4-methylcoumarin
AOMK :	acyloxyméthyl-cétone
Apaf-1 :	Apoptotic Protease Activating factor-1
ApCARD :	Domaine CARD de Apaf-1
APP :	protéine précurseur amyloïde
ATM :	Ataxia telangiectasia-mutates
ATP :	Adénosine Triphosphate
AVC :	Accident vasculaire cérébral
BAD :	BCL-2 associated agonist of Death
BAK :	BCL-2antagonist/killer 1
BAX :	BCL-2 associated X,
BHE :	Barrière hémato-encéphalique
Bid :	BH3 interacting-domain death agonist
BIM :	Bcl-2-like protein 11
BIR :	Baculovirus Inhibitior of apoptosis protein Repeat
BMF :	Bcl2 Modifying Factor
Boc :	Benzyloxycarbonyl
CaMKII :	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CARD :	CAspaseRecruitment Domain
CASP- :	Caspase-
CD95 :	cluster of différenciation 95
Cdc42 :	cell division control protein 42
Cdk1:	Cycline-dependant kinase 1
cFLIP :	cellular FLICE-like inhibitory protein
CHO :	Aldéhyde
Cmk :	Chloromethylketone
C-ter :	Extrémité Carboxy-Terminale
DAMPs :	Danger-Associated Molecular Patterns
DD :	Death Domain
DED :	Death Effector Domain
DEVD :	Aspartyl-Glutamyl-Valyl-Aspartate
DF :	Death Fold

DISC :	Death-Inducing Signal Complex
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
FADD :	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas :	First apoptosis Signal
FasL :	Fas Ligand
Fmk :	fluoromethylketone
hAPP :	human Amyloïd Precursor Protein
Htt :	Huntingtine
IAP :	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE :	interleukine-1 eta Converting Enzyme
Ich-1 :	interleukin-1 eta converting enzyme homologue 1
IER1 α :	Inositol-requiring enzyme 1
IL :	Interleukine
IPAF :	ICE-protease-activating factor
КТ:	Kinétochore
LRR :	Leucin-Rich Repeat
LTD :	Long term depression
LTP :	Long term potentiation
M :	unité de concentration, mol/L
MA :	Maladie d'Alzheimer
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MEFs :	fibroblastes embryonnaires de souris
MEM :	membrane externe mitochondriale
MH :	maladie de Huntington
MP :	Maladie de Parkinson
NB-ARC :	Nucleotide Binding-ARC
Nedd-2 :	Neural precursor cell expressed developmentally downregulated-2 (gene)
NEDD-2 :	Neural precursor cell expressed developmentally downregulated-2 (enzyme)
NF-κB :	nuclear factor-kappa B
NGF :	facteurs de croissance neuronaux
NLRC4 :	CARD-containing NLR-4
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NO :	monoxyded'azote
NOD :	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
N-ter :	Extrémité Amino terminale
OPh :	Difluorophenoxymethyl-cétone
PAMPs :	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PARP1:	Poly ADP-ribose polymerase 1

- Pc-: Pro-Caspase-
- pc- 9CARD : domaine CARD de la pro-Caspase-9
- PDMS : Poly-Diméthylsiloxane
- PIDD : p53-induced protein with a death domain
- PMEM : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
- PMM : perméabilisation membrane mitochondriale
- PSI-BLAST: Position-Specific Iteractive Basic Local Alignement Search Tool
- PS-SCL : Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library
- PYD: Pyrin-Domain
- RAIDD : Receptor-interacting protein (RIP)-Associated ICH-1/CED-3 homologous death protein

with a Death Domain.

- RCD : Regulated Cell Death
- RE : Réticulum Endoplasmique
- RFU : Relative Fluorescence Units
- RGC : Retinal ganglion cell
- RhoA : Ras homologous member A
- RING : Really Interesting New Gene
- RIPK1 : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
- ROCK : Rho-associated protein kinase
- SMAC : Second Mitochondrial Activators of Caspases
- TNF: Tumeur Necrosis Factor
- TNFR : TNF receptor
- TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
- TRAIL-R1: TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1
- UPS : ubiquitin-proteasome system
- XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

CODE A UNE ET TROIS LETTRES DES ACIDES AMINES

- G Glycine Gly
- P L Proline Pro
- A L Alanine Ala
- V L Valine Val
- L L Leucine Leu
- I L Isoleucine Ile
- M L Methionine Met
- C L Cysteine Cys
- F L Phenylalanine Phe
- Y L Tyrosine Tyr
- W L Tryptophan Trp
- H L Histidine His
- K L Lysine Lys
- R L Arginine Arg
- **Q** L Glutamine Gln
- N L Asparagine Asn
- E L Acide Glutamique Glu
- D L Acide Aspartique Asp
- S L Serine Ser
- U Sélénocystéine
- T L Threonine Thr

AVANT-PROPOS

Les Caspases sont des endoprotéases à Cystéine intracellulaires. Leurs propriétés enzymologiques sont gouvernées par une dyade catalytique Cystéine-Histidine, où la cystéine initie l'hydrolyse de substrats peptidiques, d'une part, et par une spécificité stricte de clivage après un résidu Aspartate, d'autre part. Elles sont majoritairement connues pour leurs rôles clés dans l'initiation et l'exécution de la mort cellulaire programmée par apoptose ainsi que dans la régulation de l'inflammation. Aussi, leurs implications dans la kératinisation est un fait avéré depuis quelques années. Les Caspases participent également à d'autres processus physiologiques majeurs tels que la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que dans le développement neuronal, la guidance axonale et la plasticité synaptique.

Parmi ces enzymes, la Caspase-2 (NEDD-2, ICH-1, CASP-2) est particulière. Pendant des années il a été difficile de comprendre son rôle dans l'apoptose ou dans d'autres processus physiologiques, puisque les souris constitutivement déficientes en cette enzyme ne présentaient pas de phénotypes majeurs. Toutefois, il est clair aujourd'hui qu'elle initie l'apoptose suite à de nombreux stress cellulaires (déstabilisation du cytosquelette, dommages à l'ADN, chocs thermiques, ...). En plus de ces fonctions apoptotiques, la Caspase-2 est impliquée dans le maintien de la stabilité du génome, la régulation du stress oxydant, la suppression de tumeur ainsi que dans des processus neurodégénératifs aigus et chroniques. Depuis quelques années les preuves s'accumulent quant au rôle de la Caspase-2 dans les mécanismes pathologiques associés à la maladie d'Alzheimer. Ces observations suggèrent qu'elle pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique de choix de cette pathologie, qui est la quatrième cause de mortalité en France.

Une solution serait de disposer d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques qui permettraient, d'une part, de mieux appréhender les fonctions de la Caspase-2 dans la physiologie et la pathologie du neurone et, d'autre part, qui constitueraient une base pour un développement thérapeutique. Cependant, de telles molécules n'existent pas aujourd'hui.

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de thèse, réalisées autour de la découverte et de la validation d'inhibiteurs pharmacologiques de la Caspase-2.

AVANT-PROPOS

La première partie de ce document propose une vaste introduction au monde des Caspases avec une attention particulière sur les rôles de la Caspases-2, suivie d'un bilan sur les inhibiteurs de Caspases disponibles aujourd'hui.

La deuxième partie de ce manuscrit présente les objectifs et les moyens mis en œuvre, qui ont guidés ces travaux de thèse.

Sont ensuite présentées les approches méthodologiques employées et les expériences réalisées.

La quatrième partie est divisée en quatre chapitres et présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse.

Ces résultats sont ensuite discutés dans une cinquième partie.

Enfin, ce manuscrit s'achève sur une dernière partie consacrée à la conclusion générale et à la mise en perspective des résultats obtenus.

I. « Alice in Caspase Land »

A. Préambule

Les enzymes protéolytiques, ou protéases sont des enzymes clés des processus biologiques dans tous les organismes vivants puisqu'elles régulent le devenir, la localisation ainsi que l'activité de nombreuses protéines, contribuant ainsi à la transmission des signaux dans la cellule. Ainsi, elles sont impliquées dans des processus biologiques majeurs, qui assurent l'intégrité cellulaire mais également celle de l'organisme, tels que : la réplication et la transcription de l'ADN, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'angiogenèse et neurogénèse mais aussi le remodelage et à la morphogénèse des tissus, l'homéostasie cellulaire, la coagulation sanguine, l'inflammation, l'immunité, l'autophagie, la sénescence, la nécrose et l'apoptose. Compte tenu de leurs rôles cruciaux dans la cellule, elles sont soumises à une régulation fine de leurs activités. Cependant, une altération du système de protéolyse conduit à de nombreuses pathologies telles que : les cancers, les pathologies neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires. En conséquence, de nombreuses protéases attirent l'attention des industries pharmaceutiques en tant que cibles thérapeutiques ou biomarqueurs (López-Otín C. *et al.,* 2008 ; Turk B. et al., 2012a ; Patel S. 2017).

1. Protéases : Nomenclature

Les protéases catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques établies entre les acides aminés d'une protéine, et constituent l'une des plus vastes familles d'enzymes puisque 500 à 600 protéases codées par 2 % du génome ont été identifiées chez l'homme (Turk B. 2006). La classification établie par le Comité de Nomenclature de l'Union internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB) anciennement *Enzyme Commision* (EC; publication en 1964 et mise à jour en 1978) se base sur l'activité de l'enzyme et consiste en un nom systématique EC suivi de 4 chiffres (ex : EC x.x.x.x). Les protéases hydrolysent une liaison au « centre » d'une chaîne polypeptidique et portent le nom de protéinases ou d'endoprotéases, EC 3.4.21-24.X. Ces dernières sont classées selon la nature du résidu responsable de l'activité enzymatique, on distingue alors les endoprotéases à Sérine (EC 3.4.21), à Cystéine (EC 3.4.22), à Acides Aspartiques (EC 3.4.23), à Thréonine (EC 3.4.25) ainsi que les metallo-protéinase (EC 3.4.24).

La classe EC 3.4.99 regroupe les endoprotéases dont le mécanisme de catalyse demeure inconnu (Garcia-Carreno F.L. *et al.,* 1997). Actuellement le terme protéase est synonyme de peptidase et comprend à la fois les endo- et les exopeptidases.

La terminologie pour les familles et les clans de protéases, largement utilisée dans la communauté scientifique, est issue de la base de données MEROPS (Rawlings N.D. et al., 2012, 2016), fondée en 1996. Cette classification hiérarchisée, établie pour les peptidases en 1993 par Rawlings et Barrett (Rawlings N.D. et al., 1993) puis enrichie avec les inhibiteurs en 2004, est basée sur les alignements de séquences et de structures des sites actifs de toutes les protéases connues. Chaque identifiant d'un clan débute par la première lettre du nom du résidu impliqué dans la catalyse, « C » pour Cystéine, suivie d'une seconde lettre, par exemple le « D » en référence aux familles qui présente un repliement tertiaire ou une séquence, semblable aux Caspases (Clay Clark A. 2016). Chaque famille quant à elle, est identifiée par une lettre suivie d'un nombre indépendant du clan auquel la famille appartient (ex : C14 pour les caspases et ses orthologues).

La topologie linéaire des interactions protéase-peptide substrat est définie par la nomenclature de Israel Schechter et Arieh Berger de 1967 (Schechter I., Berger A. *et al.,* 1967). Comme représenté en **Figure 1**, le site actif de l'enzyme est composé de sous sites : S1-Sn et S1'-Sn' qui interagissent respectivement avec les résidus P1-Pn et P1'-Pn' du substrat, la liaison scissile correspondant à la liaison peptidique P1-P1' où P1 correspond au résidu N-terminal et P1' au résidu C-terminal par rapport à la liaison hydrolysée. Des interactions supplémentaires s'établissent entre les résidus Pn ou Pn' et Sn ou Sn' de l'enzyme afin de renforcer l'interaction. L'ensemble de ces interactions conditionnent alors la spécificité de l'enzyme pour son substrat.



Figure 1. Topologies des interactions protéase-peptide substrat selon la nomenclature de Schechter et Berger. La surface du site actif de l'enzyme, capable d'accommoder une chaîne peptidique correspondant au substrat est divisée en sous-sites S1-Sn et S1'-Sn' reconnaissant respectivement les résidus P1-Pn en N-terminal du substrat et P1'-Pn' en C-terminal par rapport à la liaison scissile P1-P1'. La structure du site actif détermine donc quels résidus du substrat peuvent se fixer aux sous sites de la protéase déterminant ainsi la spécificité de substrat de celle-ci (Turk *et al.,* 2006).

2. Clan CD, Famille C14 : Les Caspases

Les Caspases sont des endoprotéases intracellulaires. Le terme Caspase, pour « Cysteine-dependant aspartate-specific protease », dérive de deux propriétés catalytiques de ces enzymes. En effet, le « c » fait référence à la cystéine catalytique qui joue le rôle de nucléophile au cours de l'hydrolyse de la liaison peptidique, et « aspase » pour leur spécificité stricte de clivage après un résidu Asparte, une caractéristique propre à cette famille C14A de protéase chez les mammifères. (Ramirez M.L.G *et al.,* 2018)

L'histoire des Caspases débute en 1989 avec l'identification de l'enzyme humaine de conversion de l'interleukine-1 β (ICE) (Cerretti D.P. *et al.*, 1992 ; Thornberry N.A. *et al.*, 1992). Quelques mois plus tard en 1993, l'équipe du Dr. Yang démontre que le produit du gène codé par *CED3* impliqué dans l'exécution de l'apoptose dans le développement de *Caenorhabditis elegans* est un homologue de ICE (Yuan J. *et al.*, 1993). Par la suite, des études complémentaires ont montré qu'une surexpression de ICE dans des cellules de mammifères était suffisante pour induire une mort par apoptose dans ces modèles. Les Caspases pouvaient jouer un rôle analogue à *ced-3* dans la mort cellulaire programmée chez les mammifères.

En termes de structure ICE, renommée CASP-1 (CASP-1), est une protéase à cystéine homodimérique avec une structure distincte des autres protéases à Cystéine (Walker N.P.C. et al., 1994). Cette propriété de CASP-1 lui a permis d'être la fondatrice du clan CD. Par définition, ce clan regroupe les protéases à cystéine qui utilisent un résidu cystéine pour initier l'hydrolyse, précédent au clivage de liaisons peptidiques. Ces enzymes présentent une spécificité stricte de reconnaissance du résidu en P1 et possèdent une dyade catalytique Cystéine/Histidine hautement conservée. En 1994, l'étude structurale de ICE a révélé un nouveau modèle de repliement tertiaire créant ainsi dans le clan CD, la famille C14, considérée aujourd'hui comme la famille des Caspases (Wilson K.P. *et al.*, 1994). Depuis, le clan CD s'est enrichi de six nouvelles familles : Clostripains (C11) ; Legumains (C13) ; Gingipains (C25) ; Separases (C50) ; le domaine cystéine peptidase de la toxine MARTX pour *multi-functional autoprocessing repeats in toxin* (C80) ; et plus récemment du facteur de virulence PrtH de la bactérie *Tannerella forsythia* (C85) (**Table 1**) (Fuentes-Prior P. *et al.*, 2004 ; McLuskey *et al.*, 2015).

FAMILY	Representative member	Specificity in P1	Bacteria	Archea	Protozoa	Fungi	Plants	Viruses	Animals
C11	Clostripain	Arginine	1	1	√	x	1	X	x
C13	Legumain	Asparagine et Aspartate	√	~	√	~	√	x	1
C14A	Caspase	Aspartate	x	x	X	х	x	1	~
C14B (P)	Paracaspase	Arginine	√	1	x	x	x	x	~
C14B (M)	Metacaspase	Arginine et Lysine	V	√	√	√	√	x	x
C25	Gingipain R	Arginine ou Lysine	√	1	x	x	x	x	x
C50	Separase	Arginine	x	x	√	√	√	x	1
C80	MARTX-CPD	Leucine	~	x	х	x	x	x	1
C84	PrtH peptidase	Arginine	√	x	×	x	x	x	x

 Table 1. Distribution phylogénétique et spécificité de clivage des familles du clan CD (McLuskey K. et al., 2015)

3. Famille C14 : Phylogénie

Les abréviations CASP- pour Caspase- et pc- pour pro-Caspase seront utilisées tout au long du manuscrit.

Dans le clan CD, la famille C14 est la seule famille distribuée dans tout le règne du vivant avec toutefois une distribution par branches phylogénétiques de chaque sous-famille (**Table 1**). En revanche, la spécificité stricte de reconnaissance d'un Aspartate en P1 est propre aux métazoaires.

Compte tenu de l'importance des Caspases chez les mammifères, une recherche d'orthologues chez les plantes et autres organismes non-métazoaires a été entreprise. À l'aide d'un outil d'alignement de séquence PSI-BLAST - *Position-Specific Iteractive Basic Local Alignement Search Tool* - sur la base de la séquence primaire comprenant et encadrant le site actif. Deux nouveaux groupes de protéases ont pu être identifiés comme nouvelle sous famille de Caspases (CASP) (C14B). Ces enzymes nommées Métacaspases (C14B (M)) et Paracaspase (C14B (P)) sont toutes deux présentes dans le génome des Archées et des Bactéries. De plus, les Métacaspases sont également retrouvées chez les protozoaires, champignons et plantes tandis que les Paracaspases sont identifiées dans le règne animal, alors que les Métacaspases en sont absentes. Comme présenté en **Table 1**, cette famille C14 présente des spécificités de substrats diverses puisque les Caspases (C14A) reconnaissent une Aspartate en P1 tandis que les Méta- et Paracaspases reconnaissent des résidus basiques Arginine et/ou Lysine (Wang Y. *et al.,* 2001 ; Klemenčič M. *et al.,* 2017).

Pour les Métacaspases, bien que l'implication de Yca1 dans les processus de mort cellulaire ait pu être mise en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, un lien avec les mécanismes de mort cellulaire n'a pas pu être établit pour toutes les métacaspases. Cependant, un grand nombre d'autre fonctions ont pu être définies dans des processus cellulaires variés, tels que la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, le stress du réticulum endoplasmique (RE), ainsi que dans la clairance d'agrégats et dans la virulence. Pour les Paracaspases, la seule structure référencée est celle de l'enzyme humaine et murine MATL1 – *Mucosa-Associated Lymphoid tissue translocation protein 1*. Cette enzyme semble être impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), dans la prolifération des lymphocytes B et T ainsi que dans la production de la cytokine Interleukine-2 (IL-2) (Ruefli-Brasse A.A. et al., 2003)

Chez les métazoaires, on dénombre actuellement 3 Caspases chez le nématode, 7 chez la drosophile, 4 chez le poulet, 4 chez le poisson, 8 chez les amphibiens, 1 bovine, 11 murines et 13 humaines, les dernières Caspases identifiées chez les mammifères (-15, -17, -18) étant absentes du placenta contrairement à la CASP-16 (Lamkanfi M. *et al.*, 2002 ; Shalini S. *et al.*, 2015). Ces valeurs témoignent d'une corrélation entre le nombre de Caspases et la complexité de l'organisme considéré.

La structure générale de ces Caspases consiste en un pro-domaine N-terminal de taille variable, suivi d'une grande sous-unité de 20 kDa, p20, et d'une petite sous-unité de 10 kDa, p10 (Figure 2A). Un premier arbre phylogénétique proposé en Figure 2 se base sur la séquence primaire en acides aminées des sous-unités p20 et p10, l'analyse exclue donc les pro-domaines qui ne sont pas impliqués dans la catalyse et qui, par ailleurs sont retrouvés dans d'autres protéines. L'analyse phylogénétique établie entre ces espèces montre une ségrégation en trois groupes (Figure 2B), qui au-delà des analogies de séquences regroupent des Caspases avec des activités biologiques communes. Toutes les Caspases de *C.elegans* se retrouvent dans le premier groupe (Cluster I) qui contient les Caspases aux propriétés inflammatoires : CASP-1, CASP-4 et -5 avec leur homologue -11 murins, et également les CASP-2 et -14 ainsi que la CASP-13 qui est l'orthologue de la CASP-4 chez le bovin (non représenté en Figure 2). Toutes les Caspases impliquées dans l'exécution de l'apoptose appartiennent au groupe II (Cluster II) et présentent toute un pro-domaine court avec l'exception de STRICA de *Drosophilia Melanogaster*. Tandis que les protéases initiatrices de l'apoptose (CASP-8, -9, -10) se trouvent concentrées dans le groupe III (Cluster III).



Figure 2. Distribution phylogénétique des Caspases

(A) Domaines architecturaux des Caspases chez les Métazoaires. La séquence primaire générique des Caspases se présente avec un prodomaine N-terminal nécessaire au recrutement de protéines adaptatrices suivi d'une grande sous-unité p20 et d'une petite sous-unité p10. (B) Distribution phylogénétique des Caspases sur la base des séquences des domaines p20 et p10. Les Caspases inflammatoires sont réparties dans le cluster I avec toutes les Caspases de *C.elegans*. Les Caspases initiatrice (Cluster III) et exécutrices (Cluster II) de la mort cellulaire programmée par apoptose sont scindées en deux groupes. *Danio rerio* (z), *Xenopus laevis* (x), *Gallus gallus* (g), *Mus musculus* (m), *Homo sapiens* (h), DED : Death Effector Domain, CARD : Caspase Recruitment Domain. (Lamkanfi M. *et al.*, 2002)

Dans la suite de ce manuscrit, l'étude se portera exclusivement sur les Caspases de la sousfamille C14A.

4. C14A : Classification par fonctions biologiques

Il existe de nombreux critères pour classer les Caspases, pourtant il s'avère que nombre de ces méthodes résultent en des groupes similaires, suggérant une forte corrélation structure-fonction entre les membres de cette sous famille. Une première classification des Caspases humaines présentée en **Figure 3A**, repose sur leurs fonctions biologiques qui concordent également avec les identités de séquences. Ainsi, on distingue deux groupes majeurs, d'une part les CASP-1, -4, -5, -12 qui sont impliquées dans l'inflammation et d'autre part les CASP-2, -3, -6,-7, -8, -9, -10 qui sont les Caspases apoptotiques. Ces dernières sont subdivisées en initiatrices (-2, -8, -9, -10) ou exécutrices (-3, -6, -7) de l'apoptose sur la base de la présence ou de l'absence de domaines protéiques d'interactions spécifiques sur le prodomaine N-terminal.

La CASP-14 est impliquée dans la différentiation des kératinocytes. Et, les rôles de la CASP-16, non représentée en **Figure 3**, ne sont pas encore élucidés mais elle présente une forte analogie de structure avec la CASP-14 (Fuentes-Prior *et al.*, 2004).

En Figure 3B, le dendogramme offre une vision globale de l'évolution phylogénétique des Caspases humaines au sein du clan CD et présente une répartition similaire à l'arbre phylogénétique présenté en Figure 2B ainsi qu'au classement des Caspases établit par fonction en Figure 3A (Ramirez M.L.G. *et al.,* 2018). Étayant la notion de forte corrélation structure-fonction entre les membres de cette sous famille. Une divergence est tout de même révélée quant au positionnement de la CASP-2 dans ces différents classements, inflammatoire ? Apoptotique ? ou autre ? la distinction n'est pas nette dans ces trois méthodes de classification.



Figure 3. Classification des Caspases par fonctions biologiques

(A) Classification fonctionnelle et organisation des domaines structuraux des Caspases placentaires de mammifères. Il existe 13 Caspases humaines, subdivisées en trois groupes selon leurs fonctions : inflammation et différentiation (CASP-1, -4, -5, -12, -14, -16), effectrices de l'apoptose (CASP-3, -6 et -7) et initiatrices de l'apoptose (CASP-2, -8, -9 et -10). On distingue les Caspases initiatrices des effectrices par l'existence de domaines d'interactions protéiques localisés au niveau du pro-domaine N-terminal. La position des sites de de maturation clivage sont donnés avec l'Aspartate en P1 en gras en rouge, en gras italique sont indiqués les sites potentiels de clivage non confirmé in vitro. En noir, les numéros de séquences correspondent aux données Swiss Prot, en rouge les numéros de séquences sont basés sur la référence établit à partir de la CASP-1. D'après Fuentes-Prior et al., 2004. (B) Dendogramme des protéases du clan CD illustrant les relations évolutives entre les Caspases humaines et leurs homologues. Les Caspases Apoptotiques sont colorées en camaïeu de vert, les Caspases inflammatoires sont illustrées en rouge. Les 4 membres restant du clan CD sont en bleu. Les Caspases-2 et -14 ne sont pas assignées comme Caspase inflammatoires ou apoptotiques dans cette étude. FLIP et CASP-12 sont des pseudo-protéases puisqu'au point de vue du repliement elles sont considérées comme appartenant au clan CD mais des mutations dans leur sites actifs les rendent catalytiquement inactives (Ramirez M.L.G. et al., 2018). CARD : Caspase recruitment domain , DED : Death Effector Domain, FLIP : FLICE-like inhibitory protein.

B. Biochimie des Caspases

Dans la suite du manuscrit, la numérotation des acides aminés suit la convention établie pour la CASP-1, pour les exceptions la numérotation utilisée sera précisée.

1. Base moléculaire de l'activation des Caspases

Compte tenu de leurs rôles physiologiques majeurs, une activation anarchique des caspases peut s'avérer dangereuse pour la cellule, ainsi ces dernières sont synthétisées et maintenues dans un état inactif, appelé forme zymogène ou pro-Caspase. À l'exception de la CASP-1, enrichie au niveau des monocytes et macrophages et de la CASP-14, exclusivement exprimée au niveau des kératinocytes, les Caspases ont une expression ubiquitaire. Dans la cellule, le pool de pro-Caspases peut être rapidement activé suite à un signal de mort. Ce signal est alors transduit *via* une cascade protéolytique qui suit une hiérarchie bien définie, où des Caspases initiatrices (-2, -8, -9, -10) sont activées puis vont activer les Caspases exécutrices (-3, -6, -7) qui seront alors capables de cliver leurs substrats cibles (Shi Y. 2004a ; Cullen S.P., Martin S.J. *et al.*, 2009 ; Parrish A.B. *et al.*, 2013). Pour toutes ces caspases, la forme active est une forme dimérique, caractérisée d'homo ou hétérodimères.

1.1. Organisation structurale

L'activation de la majorité des protéases, qu'elles soient intra ou extracellulaires, a lieu suite à la libération d'un fragment d'activation en N-terminal du zymogène, communément appelé pro-peptide (Stennicke H.R., Salvesen G.S. *et al.*, 1999). Ce mode d'activation exclu les Caspases, puisque le modèle général d'activation tient compte de deux paramètres : d'une part, l'association de deux domaines catalytiques, ou monomères, pour former le dimère actif, et d'autre part la protéolyse du *linker* qui lie la grande et la petite sous-unité. Le mode d'activation au sein de cette famille est propre à chaque type de Caspases puisque les structures latentes des différents groupes sont distinctes. En effet, les Caspases initiatrices ainsi que les caspases inflammatoires et la CASP-14 sont synthétisées sous forme de monomères.

Bien qu'elles existent sous forme de dimères ou de monomères, les pro-Caspases partagent une organisation commune. En effet, chaque unité monomérique se compose de trois domaines : un pro-domaine N-terminal de taille variable (15 à 219 acides aminés), une grande sous-unité de 17 à 20 kDa, une petite sous-unité de 10 à 12 kDa, appelées respectivement p20 et p10, par convention. Cette structure également décrite comme

domaine catalytique s'inscrit dans une structure ellipsoïde de 25 Å x 50 Å x 30 Å (Walker N.P.C. et al., 1994 ; Wilson K.P. *et al.*, 1994 ; Fuentes-Prior P. *et al.*, 2004).

Le pro-domaine en N-terminal possède de nombreuses fonctions, parmi elles : facilitation de la dimérisation, séquestration des enzymes dans le cytoplasme et maintien de la pro-forme dans un état inactif (MacKenzie S.H., Clark A.C. *et al.*, 2012). À la différence des Caspases exécutrices, les initiatrices possèdent un long pro-domaine N-terminal qui contient des motifs de reconnaissance, impliqués dans des interactions homotypiques qui vont être essentielles à la dimérisation et/ou au recrutement de ces enzymes au niveau de plateformes moléculaires pour faciliter leur activation. En effet, les Caspases initiatrices -8 et -10 possèdent deux *Death Effector Domain* (DED) tandis que les CASP-2 et -9 possèdent un domaine de recrutement CARD pour *Caspase Recruitment Domain* (**Figure 3A**). La grande sous-unité, p20, contient la Cystéine 285 (Cys-285) et l'Histidine 235 (His-235) qui forment la dyade catalytique tandis que la petite sous-unité, p10, apporte les résidus nécessaires à la formation du sillon accueillant le substrat. Les régions non structurées liant le pro-domaine N-terminal à la grande sous-unité ou le *linker* entre la grande et la petite sous-unité sont sujets à protéolyse au cours des processus de maturation (Pop C., Salvesen G.S. *et al.*, 2009).

Au cours des processus d'activation et de maturation, les grandes et petites sousunités qui composent par la suite l'enzyme active, sont libérées par clivage du *linker* après un Aspartate (Asp (P1) - X (P'1)) (**Figure 3A**). La présence de ce type de résidu dans la zone de maturation témoigne de la capacité des Caspases à s'auto-activer ou à être activées par une autre caspase pour une amplification en cascade du signal (Nicholson D.W. 1999).

1.2. Pro-Caspases monomériques et plateformes d'activation

L'organisation structurale des protéines adaptatrices requises pour l'activation des Caspases initiatrices et inflammatoires au sein des plates-formes d'activation, doit remplir trois critères. En premier lieu, la protéine doit posséder une région capable d'interagir directement ou indirectement avec les Caspases. Ces domaines sont issus de la super-famille des *Death-Fold* (DF) qui contient quatre membres distincts : les domaines de mort ou *Death Domain* (DD) ; le domaine DED ; le domaine CARD ainsi que le *Pyrin-Domain* (PYD). En second lieu, ces plates-formes doivent posséder un domaine d'oligomérisation qui facilite la formation de dimères ou d'oligomères. Enfin, la présence d'un domaine de régulation de l'activité de la plateforme est également nécessaire.

1.2.1. Activation des Caspases initiatrices (-2, -8, -9, -10)

Les Caspases initiatrices permettent la conversion d'un signal cellulaire de mort en une activité protéolytique puisque leur rôle est d'activer les Caspases exécutrices, en particulier les CASP-3 et -7. Bien qu'il soit clair que les zymogènes des Caspases initiatrices sont conservés sous forme de monomères inertes dans la cellule, leur mécanisme d'activation, lui, soulève encore quelques interrogations. Cependant, il existe un modèle d'activation largement admis qui est le modèle de dimérisation induite par proximité ou *induced-proximity dimerization* (Muzio M. *et al.*, 1998 ; Salvesen G.S., Dixit, V.M. *et al.*, 1999 ; Shi Y. 2004b). Ce modèle, largement testé et validé, repose sur le fait que les Caspases initiatrices nécessitent une étape de dimérisation pour être actives, et que cet évènement est une étape fondamentale du processus d'activation (Ramirez M.L.G. *et al.*, 2018). Cette étape de dimérisation est déclenchée au niveau de plateformes multimériques spécialisées qui permettent le recrutement de nombreux zymogènes au sein d'un complexe dit d'activation.

1.2.1.1. Dimérisation induite par proximité

C'est en 1998, que fut introduit le modèle induit par proximité (Muzio M *et al.,* 1998), pour rationaliser l'activation des Caspases initiatrices sachant qu'aucune autre protéase ne se trouvait en amont de leurs voies de signalisation pour les activer. Dans ce modèle initial, il était proposé qu'une activité résiduelle du zymogène des Caspases initiatrices était suffisante pour cliver et activer une autre pro-Caspase, à condition que les deux zymogènes soient apportées à proximité de plateformes d'activation multiprotéiques ; le PIDDosome pour CASP-2 ; le DISC - *Death-Inducing Signaling Complex* - pour les CASP-8 et -10 et l'Apoptosome pour la CASP-9. Il est à noter que l'on parle alors de zymogénicité pour caractériser cette activité enzymatique du zymogène qui se définit par le ratio de l'activité de l'enzyme active par rapport à l'activité du zymogène vis-à-vis d'un substrat donné.

À cette époque, il semblait donc que la protéolyse soit nécessaire à l'activation. Finalement, cette étape de clivage n'est pas essentielle à l'activation de ces Caspases initiatrices et constitue plutôt une étape de maturation qui favorise la stabilisation du dimère (Boatright K.M. *et al.*, 2003).

Depuis quelques années, il est admis que la formation du dimère est une étape clé de l'activation des Caspases initiatrices. Ainsi, un nouveau modèle, basé sur le précédent, a été proposé à partir des travaux de Boatright K.M. *et al.*, en 2003 et est représenté en **Figure 4**. Dans la cellule, les monomères existent en équilibre avec les formes dimériques, toutefois, la

forme monomérique majoritairement présente en condition physiologique. En effet, les constantes de dissociation, modélisées par le K_D pour les CASP-8 et -9 sont de respectivement 50 et 100 µM, donc bien au-dessus des concentrations physiologiques (Renatus M. *et al.*, 2001, Pop C *et al.*, 2008, Mace P.D. *et al.*, 2014). Ainsi, les zymogènes sont recrutés au niveau des plateformes d'activation, PIDDosome, DISC et Apoptosome *via* leurs domaines d'interactions CARD ou DED. Ensuite, la nature multimérique des plateformes permet d'augmenter considérablement la concentration locale en pro-Caspase, qui dépasse alors le K_D, favorisant ainsi la formation de dimère. Autrement dit, le recrutement des pro-Caspases au niveau des complexes oligomériques force l'augmentation de la concentration locale en enzyme, convertissant ainsi une réaction de second ordre en une réaction de premier ordre qui permet de déplacer l'équilibre en faveur de la forme dimérique.

Le modèle d'activation induit par proximité accordait une importance majeure au clivage protéolytique dans le processus d'activation de ces Caspases. Cependant, les étapes de clivages consisteraient davantage en des étapes de maturation qui stabilisent le dimère nouvellement formé (Shiozaki E.N. *et al.*, 2003).



Figure 4. Modèle d'activation des Caspases initiatrices - 8 et -9.

Les caspases initiatrices sont synthétisées sous forme de monomère catalytiquement inactif. Dans la cellule, l'équilibre est majoritairement en faveur de la forme monomérique, avec des K_D supérieurs à 50 μ M, donc bien au-dessus des concentrations physiologiques, qui avoisinent environ 20 nM. Le recrutement des monomères au niveau de platesformes oligomériques d'activation, permet d'augmenter la concentration locale en Caspases, qui devient supérieure au K_D , favorisant ainsi le déplacement de l'équilibre vers la forme dimérique (Boatright K.M. *et al.*, 2003).

1.2.1.2. Le DISC : Plateforme d'activation de la Caspase-8

Le Death-inducing signaling complex ou DISC est une plateforme permettant l'activation des Caspases iniatrices-8 et -10. Ce processus requiert une étape de dimérisation selon le modèle de dimérisation induite par proximité ainsi que des étapes de clivage protéolytiques de maturation. Cette plateforme est un assemblage transmembranaire qui agit comme un conduit pour la transmission de signaux extracellulaires provenant de l'engagement de récepteurs de mort.

Fas (First apoptosis Signal) également connu sous le nom d'APO-1 (Apoptosis Antigen-1) ou CD95 pour *cluster of différenciation* est un membre de la grande famille des récepteurs de mort, un sous-ensemble de la famille des récepteurs au Facteur de Nécrose Tumorale ou TNF (Tumeur Necrosis Factor) (Nagata S. et al., 1995; Nagata S. 1997; Peter M.E. et al., 2003; Wilson N.S. et al., 2009). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire qui possède dans sa région intracellulaire un module adaptateur, ou domaine de mort, DD - Death Domain - capable d'interactions homotypiques avec d'autres partenaires. Ainsi, sur la face extracellulaire, suite à la fixation d'un ligand FasL (Fas Ligand) hexamèrique (association de deux trimères) les récepteurs se regroupent tandis que sur la face cytosolique, le DD permet le recrutement de l'adaptateur protéique FADD - Fas-Associated protein with Death Domain- par son DD localisé en C-terminal (Holler N. et al., 2003). FADD, qui agit comme pont entre les caspases et l'extrémité C-ter du récepteur de mort, possède à son extrémité N-ter un domaine DED qui permet à son tour de recruter les CASP-8 et/ou -10 ainsi que cFLIP - *cellular FLICE-like inhibitory* protein – via leurs domaines DEDs localisés sur leur pro-domaines (Figure 5A). Le complexe ternaire formé par Fas, FADD et les caspases et/ou FLIP constitue le DISC (Figure 5B) (Fu T-M. et al., 2016).

Les CASP-8, -10 et cFLIP possèdent deux domaines DEDs (**Figures 3A**; **5A**). Les modèles actuels suggèrent qu'un seul DED, DED2, serait responsable du recrutement des zymogènes au niveau du DISC. Cependant, ces modèles n'expliquent pas la présence d'un second domaine et ne justifient pas le fait que les deux DEDs semblent être indispensables pour le recrutement au niveau du DISC. Aussi, les données structurales du DISC obtenues par Laura S. Dickens *et al.*, en 2012 ont permis de lever le voile sur ces interrogations puisque selon ces travaux un DED serait impliqué dans le recrutement des zymogènes au niveau du DISC, tandis que l'autre permettrait le recrutement d'un nouveau zymogène. Ce recrutement se ferait par la formation d'une chaîne, ou filaments, de DEDs via des interactions avec un motif Phenylalanine/Leucine (FL) (**Figure 5C**) (Siegel R.M. *et al.*, 1998). Cette théorie est validée par le fait que les DEDs des pc-8, -10 et cFLIP peuvent s'associer entre eux mais aussi l'association peut aussi se faire entre deux partenaires protéiques différents. Enfin, leurs données montrent qu'il y a neuf fois plus de CASP-8 que de FADD dans leur DISC, étayant donc leur théorie.

Dickens L.S. *et al.,* proposent donc un modèle alternatif pour l'assemblage et la structure du DISC par lequel FADD serait en proportion inférieure et que le recrutement de la pc-8

s'effectuerait selon deux modes. D'une part, le zymogène est recruté par DED1 au DISC par l'adaptateur FADD. D'autre part, les molécules de pc-8 pourraient s'associer séquentiellement *via* leur domaine DED2 libre pour former une chaîne d'activation. L'assemblage de cette chaîne de domaines DEDs pourrait également expliquer qu'une faible proportion de DISC soit suffisante pour l'activation d'un grand nombre de CASP-8.

Au sein de ce complexe, CASP-8 et CASP-10 sont activées par homodimérisation et vont ensuite subir différentes étapes de clivages pour former des dimères matures capables de transmettre le signal de mort. Cependant, ce processus ne couvre qu'une partie du mécanisme d'activation de ces Caspases puisque d'autres protéines son également présentes au sein du DISC. Notamment cFLIP, l'homologue de CASP-8, qui possède deux domaines DEDs et qui peut également être recruté au niveau du DISC via FADD. Pour cFLIP, l'épissage alternatif de l'ARNm conduit à la synthèse d'un variant court (cFLIP_s) qui ne possède pas de domaine catalytique Caspase-like et qui entre en compétition avec CASP-8 pour le recrutement au niveau du DISC. Un deuxième variant issu de l'épissage, est long (cFLIP_L) mais son domaine catalytique Caspase-like est caractérisé par l'absence de résidus essentiels à la catalyse et à la fixation du substrat, résultant en une protéine catalytiquement inactive. L'hétérodimérisation avec cFLIP_L active CASP-8 et CASP-10 puisqu'il possède les mêmes domaines catalytiques permettant une complémentarité des monomères à l'interface de dimérisation (Boatright K.M. et al., 2004; Yu J. W. et al., 2009). De plus la formation d'hétérodimère est favorisée face à la formation d'homodimères puisque la barrière d'activation pour l'hétérodimérisation est plus faible que pour l'homodimérisation. Compte tenu du fait que cFLIP_L et pcases-8/-10 sont recrutés de manière équivalente, la formation d'hétérodimères sera privilégiée, bien que ces derniers ne puissent cliver que des substrats à proximité du DISC (Pop C. et al., 2011 ; Ashkenazi A. et al., 2014). Par conséquent une forte expression de cFLIP_L inhibe plutôt qu'active la voie extrinsèque en perturbant la maturation de CASP-8. Toutefois, parce que l'expression du gène codant cFLIP_L, CFLAR, est régulée par NFκB - Nuclear Factor-kappa B - sa concentration est variable dans la cellule et que l'épissage alternatif mène à des proportions variables des deux isoformes, l'implication de cFLIP_L dans le processus d'activation s'en retrouve impactée (Ramirez M.L.G. et al., 2018 ; Galluzzi L. et al., 2018). Pour la CASP-8, les travaux de Oberst et al., en 2010, ont démontré que la dimérisation ainsi que le clivage inter-domaines est nécessaire à son activation. En effet, le clivage en absence de dimérisation ne produit pas une enzyme active et n'entraîne pas non plus la

propagation du signal de mort, bien qu'*in vitro*, la dimérisation seule conduise à une enzyme significativement moins active mais dont l'activité résiduelle permet la propagation du signal de mort. Finalement, le processus de clivage est nécessaire pour une activation efficace de l'enzyme.



Figure 5. Assemblage du DISC, plateforme d'activation des Caspases-8 et -10. (A) Organisations en domaines des différents partenaires protéiques et hiérarchie de l'interaction au sein du DISC. (B) La fixation en extracellulaire, d'un ligand hexamèrique (association de deux trimères) entraîne le regroupement de récepteurs de morts. D'après Fu T-M. *et al.*, 2016 (C) Détail sur les deux modes de recrutement de la CASP-8 au sein du DISC. D'après Dickens L.S. *et al.*, 2012.

1.2.1.3. Apoptosome et Activation de la Caspase-9

L'activation de la CASP-9 requiert le co-facteur Apaf-1 - *Apoptotic Protease Activating factor-1*. En effet, en présence de cytochrome *c* et de dATP, Apaf-1 s'oligomérise pour former l'Apoptosome. Ce processus est l'évènement clé de l'activation de la CASP-9.

Apaf-1 est une protéine multi-domaines, divisée en trois unités fonctionnelles : un domaine CARD en N-terminal, impliqué dans le recrutement de la pc-9 ; un domaine d'oligomérisation et de liaison au nucléotide NOD, pour *Nucleotide-binding Oligomerization* également nommée région NB-ARC (Nucleotide Binding-ARC), suivi de deux domaines de régulation WD40 permettent la fixation du cytochrome *c* en C-terminal. Le domaine NB-ARC est le centre de l'oligomérisation et est par conséquent au cœur de la formation de l'Apoptosome. Sa structure consiste en un domaine ATPase suivi d'un domaine WDH pour *Winged Helix Domain*, ainsi que d'un large domaine de liaison hélicoïdal, qui permet de relier les domaines WD40
(**Figure 6A**) (Rield S.J. *et al.,* 2005). Plus précisément, le domaine ATPasique de NB-ARC, s'organise en domaine α/β et en un petit domaine hélicoïdal et appartient à la famille AAA+ dont la caractéristique est la capacité à former des oligomères (hexa- et heptamères) (Rield S.J. *et al.,* 2007).

En l'absence de signal de mort, Apaf-1 existe sous forme monomérique où les domaines WD40 maintiennent la structure dans un état inactif en venant se replier sur le reste de la protéine (**Figure 6B – « locked form »**). Suite à un signal apoptotique, la fixation du cytochrome *c* aux domaines WD40 induit le semi dépliement d'Apaf-1 et constitue la première étape de formation de l'Apoptosome. Cette étape est associée à l'hydrolyse du dATP en ADP.

Apaf-1 se retrouve alors dans une conformation semi-ouverte où les domaines CARD et NB-ARC sont dans une conformation inactive, car le domaine CARD reste inaccessible et ne peut pas permettre le recrutement de la CASP-9 ; l'oligomérisation ne peut pas avoir lieu car le domaine ATPase est lié à l'ADP. En effet, avant que le cytochrome *c* ne vienne se fixer, le dATP est lié à Apaf-1, ensuite l'hydrolyse du dATP en parallèle de la fixation du cytochrome *c* maintient Apaf-1 inhibée. Cette étape pourrait constituer un point de contrôle dans la formation de l'Apoptosome (**Figure 6B – « autoinhibited form »**).

Enfin, par des changements conformationnels, la poche de liaison à l'ADP se retrouve exposée et permet l'échange et la fixation d'ATP ou dATP – *in vivo* l'activation de l'Apoptosome favorise la fixation d'un dATP plutôt que de l'ATP bien que sa concentration soit nettement inférieure (10 μ M) à ce dernier (2 mM). Cette dernière étape stabilise le monomère Apaf-1 dans une conformation étendue capable de s'oligomériser (**Figure 6B – Apoptosome**).

L'Apoptosome est composé de sept molécules d'Apaf-1 arrangées de manière symétrique en une structure en forme de roue, où le cœur central est formé par le domaine NB-ARC avec les deux domaines WD40 projetés vers l'extérieur (Li Y. *et al.*, 2017). Dans la région ATPase le repliement α/β du petit domaine hélicoïdal lie les nucléotides ADP/dATP. Au centre de la structure les domaines CARD de Apaf-1 (ApCARD) s'organisent de manière désordonnée et s'organise que lors du recrutement de la pc-9. Aussi, suite à la formation de l'Apoptosome, le domaine CARD en N-terminal de la pc-9 (pc-9 CARD) interagit avec ApCARD permettant ainsi le recrutement de l'enzyme au niveau de la plateforme. La pc-9 se lie avec une stœchiométrie d'environ 4 : 7, car seulement 4 des 7 molécules d'Apaf-1 peuvent interagir avec pc-9 CARD du fait que le linker trop court entre ApCARD et le domaine ATPase empêche le positionnement d'autre zymogène au sein de la structure. ApCARD et pc-9 CARD forment alors

un disque au centre de l'Apoptosome qui peut être décrit comme une spirale des domaines CARDs, avec 4 domaines ApCARD qui forment une couche sur laquelle reposent 3 ou 4 pc-9 CARD. L'ensemble est stabilisé par des interactions avec des hélices α ainsi que par l'établissement de réseaux de liaisons hydrogènes et de ponts salins avec la région ATPase (**Figure 8C**).

Deux hypothèses sont avancées pour l'activation de la CASP-9 au sein de cette plateforme. Une première repose sur le modèle de dimérisation induite par proximité détaillé en page 32 (Renatus M. *et al.,* 2001 ; Rield S.J. *et al.,* 2007 ; Dorstyn L. *et al.,* 2018). Une deuxième hypothèse tient compte d'un autre modèle dit de conformation induite, où la fonction d'Apaf-1 est d'aider la CASP-9 à adopter une conformation active grâce à sa liaison à l'Apoptosome (Hu Q. *et al .* 2014 ; Li Y *et al.,* 2017). Cette activation se ferait en deux étapes, l'activation allostérique par Apaf-1 succéderait à une étape de clivage du zymogène. Dans tous les cas, la fonction principale de l'Apoptosome est de permettre l'assemblage d'un complexe multimérique entre Apaf-1 et pc-9CARD pour faciliter l'activation de la CASP-9 en augmentant la concentration locale en zymogène.

Bien que le clivage de la CASP-9 ne soit pas nécessaire à son activation, il constitue une étape de maturation importante avec notamment des conséquences au niveau de la régulation de son activité, puisque cette étape permettrait de démasquer des sites nécessaires à la régulation de l'activité par les XIAPs (Twiddy D. *et al.*, 2007). Il semblerait également que le clivage de CASP-9 contribue à la diminution de l'affinité de l'enzyme active pour l'Apoptosome en faveur de la fixation d'une nouvelle pc-9 au niveau de l'Apoptosome (Dorstyn L. *et al.*, 2018). La CASP-9 active forme un homodimère où seulement l'un des deux sites actifs est fonctionnel. En effet, une gêne stérique liée à la présence d'un résidu aromatique encombrant sur le brin $\beta 6$ au niveau de l'interface de dimérisation, prévient l'insertion de la boucle L3 et par conséquent empêche la formation d'un site actif intègre.



Figure 6. Formation de l'Apoptosome.

(A) Organisation en domaine d'Apaf-1. (B) Schéma représentatif de l'activation de l'Apoptosome (Rield S.J. et al., 2007). (C) Vue de dessus et de côté de l'Apoptosome actif. La plateforme est composée de 7 molécules d'Apaf-1 arrangées de manière symétrique en une structure en forme de roue, où le cœur central (*central hub*) est formé par le domaine NB-ARC avec les deux domaines WD40 (jaune et bleu) projetés vers l'extérieur qui sont liés au cytochrome c (rouge). Au centre de l'Apoptosome, les 4 domaines ApCARD (vert) sur lesquels reposent 4 domaines pc-9 CARD (violet) forment le *disk* (Dorstyn L. *et al.*, 2018).

1.2.2. Mécanisme d'activation des Caspases inflammatoires

Tout comme les caspases initiatrices, les caspases inflammatoires (-1, -4, -5, -12) sont synthétisées comme monomères inactifs. D'un point de vue structural, elles possèdent un long pro-domaine N-terminal avec un domaine CARD suivi du domaine catalytique avec une architecture proche de celle de la CASP-9. Dans les cellules de l'immunité innée, elles sont maintenues sous forme latente en attendant d'être recrutées au sein de plates-formes d'activation portant le nom d'inflammasomes. Au sein de ces complexes, elles sont activées par dimérisation et clivage (Martinon F. *et al.,* 2002, 2004, 2007).

De manière étonnante, le mécanisme d'action de la première Caspase identifiée et cristallisée a été le moins étudié (Fuentes-Prior P. *et al.,* 2004). La CASP-1 a été découverte en 1992 pour sa capacité à cliver et à activer la pro-interleukine- 1 β (IL-1 β) en IL-1 β . Elle est ensuite rapidement considérée comme la principale protéase qui clive et active les deux cytokines inflammatoires proIL-1 β et proIL-18 dans la plupart des conditions pathologiques. L'activation de la CASP-1 se fait par dimérisation et clivage de maturation consécutif à son recrutement au niveau de l'inflammasome. (Fernández D.J. *et al.,* 2015).

1.2.2.1. Organisation structurale et fonctionnelle de l'inflammasome

L'inflammasome est un complexe multiprotéiques servant à défendre la cellule contre l'attaque d'agents infectieux. Cette plateforme est formée par l'assemblage de trois classes de molécules : un récepteur ou senseur appartenant à la famille des récepteurs NLRs (*Nucleotide-binding domain and Leucine-Rich repeat Receptors*) ou ALRs (*Absent in melanoma* 2 (*AIM2*)-*Like Receptors*) (Rathinam V.A. *et al.*, 2012), un adaptateur protéique ASC ou PyCARD (*Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) (Ippagunta S.K. *et al.*, 2011) et la CASP-1 (Lu A. *et al.*, 2015). La structure des différentes partenaires de cette plateforme sont présentées en **Figure 7A.** L'activation de l'inflammasome mène dans tous les cas à l'activation de la CASP-1 qui peut alors cliver les proIL-18 et 1 β , qui sont ensuite sécrétées pour participer à la mort inflammatoire ou pyroptose.

- AIM2 (Absent In Melanoma 2) qui fait partie des ALRs est composée d'un domaine PYD en N-terminal et d'un domaine HIN pour Hematopoietic, interferon-inducible, nuclear localization de 200 acides aminés en C-terminal (Hornung V. et al., 2009).
- Les NLRs ont une organisation plus complexe que les ALRs avec des domaines variables en N-terminal, suivi d'un domaine d'oligomérisation capable de fixer des nucléotides, NACHT. Ce domaine partage des similitudes avec la super famille AAA+ des ATPase, que l'on retrouve chez la protéine adaptatrice responsable de la formation de l'Apoptosome, Apaf-1. En C-terminal, les NLRs présentent un domaine de répétition riche en leucine ou LRR (Leucin-Rich Repeats).

La plus grande sous-famille de NLRs est la famille NLRP, où le « P » indique la présence d'un domaine PYD en N-terminal. Cette famille de récepteurs requiert la présence de la protéine ASC pour le recrutement et l'activation de la CASP-1, parmi ces récepteurs NLRP1 et NLRP3 ont été les premiers caractérisés. Les NAIPs (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) possèdent un domaine BIR (*Baculovirus Inhibitior of apoptosis protein Repeat*) en N-terminal. Les NAIPs répondent à différents facteurs de virulence, notamment la flagelline, qui est une protéine de structure majoritaire du flagelle bactérien. NLRC4 (*CARD-containing NLR-4*), initialement nommée IPAF pour *ICE-protease-activating factor* fait également parti des NLRs, et possède en N-terminal un domaine CARD et constitue une protéine adaptatrice pour les NAIPs, qui peut recruter directement la pc-1. Ces senseurs, NLRs ou ALRs sont impliqués dans la reconnaissance de stimuli tels que : les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*),

libérés suite à des infections bactériennes, virales ou fongiques, ou les DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) émis suite à des dommages cellulaires (Lamkanfi M. *et al.*, 2014).

La protéine ASC est une protéine bi-fonctionnelle qui possède un domaine PYD en N-terminal qui lui permet d'interagir avec différents partenaires protéiques par le biais d'interactions homotypiques PYD/PYD. En C-terminal elle possède un domaine CARD qui lui permet de recruter la pc-1 *via* des interactions CARD/CARD (**Figure 7B**).



Figure 7. Organisation en domaines des acteurs de l'inflammasome.

(A) Organisation en domaines des 3 familles de molécules qui composent l'inflammasome. D'une part, les protéines récepteurs ou senseurs qui appartiennent à deux familles NLR et ALR. AIM2 appartient aux ALR et est composé d'un domaine PYD et d'un domaine HIN de 200 acides aminés. Les NLRs présente une organisation plus complexe en trois domaines, avec un domaine variable en N-ter, suivi d'un domaine impliqué dans l'oligomérisation NATCH, suivi d'un domaine LRR. NLRP3 et NAIP5 sont deux membres de la famille des NLRs, ils se distinguent par la présence d'un domaine PYD et BIR respectivement. D'autres part, les protéines adaptatrices, ASC, qui est une protéine bifonctionnelle avec un domaine PYD en N-ter pour interagir avec les senseurs protéiques et un domaine CARD en C-ter qui lui permet de recruter la CASP-1. NLRC4 appartient aussi à la famille NLR est constitué d'une protéine adaptatrice qui s'associe à NAIP5. Enfin, la CASP-1 est le dernier élément qui compose l'inflammasome, elle possède un domaine CARD en N-ter, suivi des sous-unités p20-p10. (B) Hiérarchie des interactions au seins des inflammasomes NLRP3 et AIM2. NLRP3 et AIM2 interagissent avec ASC par des interactions PYD/PYD et ASC interagit à son tour avec la CASP-1 via des interactions CARD/CARD. Lu A. *et al.*, 2014

1.2.2.2. Activation de la Caspase-1 au sein de l'inflammasome

L'assemblage de l'inflammasome et l'activation de la CASP-1 se fait en plusieurs étapes. En absence de stress, NLRs ou ALRs existent dans une conformation inactive, repliée (**Figure 8A**). En conditions pathologiques, la présence de DAMPs ou de PAMPs dans la cellule entraîne des changements conformationnels au niveau des senseurs, qui sortent alors de leurs états inhibés. Puis, les récepteurs qui possèdent des domaines PYD (NLRP3 et AIM2) vont recruter la protéine ASC par interactions PYD/PYD (**Figures 8A et B**) tandis que les récepteurs tels que NLRP1 et NLRC4 qui ne possèdent pas de domaine PYD, forment des *clusters* de NLRP1/NLRC4-CARD. Ensuite, les regroupements de ASC ou de NLRC4-CARD permettent le recrutement et l'activation de la CASP-1 son selon le modèle de dimérisation induit par proximité.

Plus précisément, pour les inflammasomes dépendants de ASC, la structure centrale s'organise autour d'interaction PYD/PYD et CARD/CARD. L'équipe de Lu A. *et al.*, en 2014 a mis en évidence que ces domaines PYD et CARD étaient capables de former des filaments. De plus, AIM2 et NLRP3 semblent pouvoir former un complexe avec ASC par des interactions PYD/PYD où ASC-PYD semble capable de former des structures filamenteuses. Par ailleurs, des études structurales révèlent qu'au sein de ces complexes, AIM2 ou NLRP3 résident à l'extrémité des structures filamenteuses qui sont composées essentiellement de ASC-PYD, suggérant ainsi que les récepteurs, ou senseurs, étaient capables de nucléer pour former des filaments de la protéine ASC au travers d'interaction PYD/PYD (**Figure 8B**).

Ils ont donc proposé un modèle d'assemblage qui implique deux étapes successives de nucléation qui induisent la formation de filaments composés de PYD et CARD. La fixation d'un ligand, déclenche l'oligomérisation d'AIM2 ou NLRP3 pour former une plateforme où les domaines PYD sont capables de nucléer pour former des filaments de l'adaptateur ASC. Dans ces filaments, les PYDs sont localisés au centre et les domaines CARDs se placent en périphérie et forment l'enveloppe supérieure du filament. Dans cette configuration les domaines CARDs permettent le recrutement la pc-1 et initient la seconde étape de nucléation qui conduit à la formation de filaments de CASP-1 via des interactions CARD/CARD.

En microscopie électronique le complexe AIM2-PYD/PYD-ASC-CARD-/CASP-1-CARD forme une structure en étoile avec AIM2 et ASC localisées au centre tandis que les filaments de CASP-1 forment les bras de l'étoile. L'inflammasome NLRP3 dépendant de ASC semble s'assembler selon un mécanisme similaire (Hauenstein A.V. *et al.,* 2015).

Le mécanisme par lequel l'inflammasome NAIP/NLRC4/CASP-1 s'assemble indépendamment de ASC reste inconnu. Cependant, il semblerait que l'ensemble Flagelline/NAIP5/NLCR4 puisse aussi former des structures filamenteuses en permettant la polymérisation de CASP-1 *via* des interactions de domaines CARD/CARD. En effet, lors de la liaison de la flagelline, une molécule de Naip5 ou 6 conduit à la formation d'un inflammasome hétéro-oligomèrique avec environ 10 NLRC4, l'ensemble forme alors un complexe en doubles disques superposés dans lequel les domaines CARDs de NLRC4 sont regroupés pour permettre le recrutement de la CASP-1 ainsi que la formation de filaments (Halff E.F. *et al.*, 2012).

Dans les deux cas, la dimérisation de la CASP-1 a lieu grâce à une augmentation locale de la concentration qui déplace l'équilibre en faveur de la formation du dimère. Au cours de la maturation, des clivages protéolytiques permettent l'obtention d'une enzyme mature.



Figure 8. Mécanisme proposé pour l'activation de la CASP-1 au sein des inflammasomes AIM2 et NLRP3. (A) Assemblage des inflammasomes NLRP3 et AIM2. Suite à la fixation d'un ligand, les récepteurs AIM2 ou NLRP3 s'oligomérisent pour former une plateforme de domaines PYD. (B) Cette plateforme qui permet alors la formation de filaments de ASC par des interactions PYD/PYD. Les domaines CARDs alors exposé en périphérie des filaments de ASC recrutent et initient la polymérisation de CASP-1 au travers d'interactions CARD/CARD. Il s'en suite une dimérisation de la CASP-1 selon le modèle de dimérisation induit par proximité, qui est suivi par des étapes de clivages de maturation. D'après Lu A. *et al.*, 2014 et Hauenstein A.V. *et al.*, 2015.

1.3. Activation des Caspases exécutrices

Les Caspases exécutrices (CASP-3, -6 et -7) partagent la même unité structurale du zymogène, en trois parties avec un pro-domaine N-terminal de petite taille (**Figure 5A**). Elles sont synthétisées dans la cellule sous forme de dimères stables. Maintenues inactives par un désordre structural au niveau du site actif, elles sont activées par clivage protéolytique entre les grandes et les petites sous-unités par les Caspases initiatrices, on parle alors de transactivation. Ces clivages induisent des réarrangements intramoléculaires qui vont stabiliser le dimère et donner lieu à une enzyme active capable de cliver des substrats cibles (Oberst A. *et al.*, 2010). Le site actif des Caspases est localisé en surface et est formé par 4 boucles cruciales : L2, L3, L4 et L2'. L2-L4 étant la contribution du premier monomère et L2'-L4' apportées par le second monomère (MacHenzie S.H. *et al.*, 2012). Les boucles L2 et L2', portées par chaque monomère, forment la région *linker* qui lient la grande et la petite sousunités (**Figure 9A**).

Le mécanisme d'activation proposé pour les Caspases exécutrices s'est basé en premier lieu sur les études cristallographiques menées sur la CASP-7 (Chai J. *et al.*, 2001). Aussi, les cristaux

ne révèlent pas de différences notables entre les structures des CASP-7 (forme active) et pc-7 (forme inactive). En effet, au niveau de la dyade catalytique, la Cystéine 285 (Cys-285) n'est déplacée que de 2,5 Å tandis que le résidu Histidine 237 (His-237) conserve la même position (Fuentes Prior P. *et al.*, 2004). Les différences majeures se concentrent au niveau des soussites de reconnaissance du substrat, au niveau des boucles L2, L3 et L4 (**Figure 9A**). En effet, dans la pc-7, trois (L2, L3 et L4) des 4 boucles formant le site actif (L2, L2', L3 et L4) sont éloignées les unes des autres, dans une conformation inadaptée à la fixation du substrat. De plus, contrairement à la forme active, les boucles L3 et L4 sont désordonnées dans le zymogène. Ce désordre affecte d'une part l'Arginine 341 (Arg-341) qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance du substrat puisqu'elle établit des contacts avec les résidus P1 et P3 du substrat et d'autre part, les résidus environnant le Tryptophane 340 (Trp-340) qui forment le sous-site de reconnaissance S2 dans la forme active de l'enzyme. Ces éléments attestent donc de la mauvaise conformation des sites de liaisons au substrat.

Le clivage du *linker* à lieu au niveau des boucles L2 et L2' qui lie la grande et la petite sousunité, après l'Aspartate 198 (**Figure 3A**). Cette étape est la première de l'activation des Caspases exécutrices. Ce clivage déclenche deux événements structuraux notables :

- D'une part, le clivage du *linker* (L2' et L2, portées par chaque monomère) génère une nouvelle extrémité N-terminale de la petite sous-unité et C-terminale de la grande sous-unité, induisant la libération de la boucle L2' qui va alors permettre la formation du faisceau de boucle en forme partiellement active avec L2 et L4, entraînant ensuite la rotation de 90° de la boucle L2. Ce mouvement de L2, permet un déplacement de la Cystéine catalytique au niveau du sous-site S1, la rendant alors accessible au solvant afin de préparer l'attaque nucléophile du substrat en P1.
- D'autre part, la boucle L3 est projetée vers la cavité centrale espace qui sépare les deux monomères au niveau des brins β6 et β6'- à l'interface de dimérisation, résultant en la formation du site actif. Dans le zymogène, l'insertion de la boucle L3 est bloquée par le *linker*. Ensuite, une portion de la boucle L3 (β_V-β_{IV}), appelée *elbow loop* (boucle coude), vient former un réseau de liaisons hydrogènes avec la boucle L2 et d'autres chaînes latérales permettant alors de stabiliser le site actif.

La structure de la CASP-7, libre, en absence d'inhibiteur révèle une forme intermédiaire dans laquelle le site actif n'est ni dans une conformation pleinement active ni désordonné (**Figure 9B**). Dans ce cas, la boucle L2' demeure au niveau de la cavité centrale et maintient une

conformation désordonnée semblable à la structure du zymogène. En conséquence, le faisceau de boucles composé de L2, L2', L3 et L4 n'est pas assemblé, bien que L3 et L4 soient dans une conformation active mais pas totalement stabilisées par les interactions avec L2'. Ce n'est que la liaison d'un substrat ou d'un inhibiteur qui entraîne une rotation de 180° de la boucle L2' lui permettant de faire un mouvement vers le haut au niveau des boucles L1 – L4 pour former alors une structure active (Riedl S.J. *et al.*, 2001).

Ces observations suggèrent que le clivage du *linker* seul ne soit pas suffisant pour activer totalement l'enzyme. La caspase active est donc une structure dynamique qui oscille entre deux états, avec une conformation désordonnée où la boucle L2' occupe la cavité centrale et où le site actif n'est pas formé et d'autre part, la conformation active où la formation du faisceau de boucles permet un parfait alignement du site actif. C'est donc la liaison du substrat qui permet de bloquer l'enzyme dans un état actif (Degretev A. *et al.*, 2003). La forte identité de séquences entre les domaines catalytiques des CASP-3, -6 et -7 (**Figure 11C**) suggèrent que les caractéristiques du zymogène ainsi que le mécanisme d'activation décrit *ci-dessus* pour la CASP-7 soit également applicable pour les CASP-3 et -6. Ainsi le clivage entre les grandes et petites sous-unités du domaine catalytique est un élément clé de l'activation des Caspases exécutrices. De plus, la libération du pro-domaine N-terminal peut succéder à l'activation mais ne semble pas indispensable à ce processus pour ces Caspases (Pop C. *et al.*, 2009).



Figure 9. Mécanisme d'activation de la pro-Caspase-7 humaine.

(A) La représentation en ruban montre la structure de la pc-7 (code PDB : 1GQF) ainsi que de l'enzyme libre (code PDB : 1K86) et liée à un inhibiteur (code PBD : 1F1J). Les changements structuraux dans l'activation de cette enzyme sont minimes exceptés pour les boucles formant le site actif : L2, L2', L3 et L4 respectivement colorées en vert, rouge et bleu. Les boucles L2 et L2' portées par l'un et l'autre des monomères permettent de lier la grande et la petite sous-unité des domaines catalytiques, comme schématisé sur la structure du zymognène, où la partie verte modélise le pro-domaine N-terminal et les parties violettes représentent les boucles D'après Fuentes-Prior P *et al.*, 2004 (B) Détail sur les mouvements des boucles au court de l'activation de la CASP-7. En bleu : pro-forme, en vert : forme libre et en rose : forme active. D'après Degterev A. *et al.*, 2003.

1.4. Activation de la Caspase-14

La CASP-14 est l'une des dernières Caspases identifiée chez les mammifères. Celle-ci possède des propriétés uniques qui la distinguent des autres membres de cette famille. En effet, contrairement aux autres Caspases, la CASP-14 n'a été identifiée que chez les mammifères terrestres ; et elle semble être absente de la majorité des tissus avec une expression et une activité, limitées à l'épiderme contrairement aux autres Caspases dont l'expression est ubiguitaire (Lamkanfi M. *et al.*, 2002 ; Denecker G. et al., 2007).

Un alignement de séquence de la région liant p20 – p10 entre les différents homologues a mis en évidence une séquence d'acides aminés hydrophobes hautement conservée qui constituerait un site potentiel de clivage par une *Elastase-like* (**Figure 10**). Ainsi, la pc-14 ne serait pas activée par clivage après un Aspartate mais plutôt après une Isoleucine (Denecker G. *et al.*, 2008).

	p20]-	protease-sensitive loop													p10				
Homo sapiens	LNNKN	QALR	A <mark>K P K</mark>	VYII	QAO	CRG	EQR	DPG	ΕT	۲.					(GD	ΕI	VΜ	VΙ	KD	SP	QT	IPT	ΥTD	AL	H	
Mus musculus	L N N K N (KALR	G <mark>K P K</mark>	VYII	QAO	RG	EHR	DPG	ΕE	LR	GNI	EEL	GG	DE	EL	G D	E -	V A	ΨL	K N	N P	QS	I P T	YTD	ΤL	н	
Macaca mulatta	<u>гиики</u>	QALR	A <mark>K P K</mark>	VYII	QAO	RG	e q k	DPG	ΕT	۲.					(G D	ΕI	VΜ	VΤ	ΚD	SP	QT	I P T	YTD	AL	н	
Felis catus	<u>гиики</u>	RALR	A <mark>k p k</mark>	VYIV	Q A Q	RG	EQR	DPG	DΤ	۷.					3	G D	DΙ	VМ	VA	КD	SP	QT	I P T	YTD	ΤL	Н	
Canis familiaris	<u>гиики</u>	RALR	A <mark>k p k</mark>	VYIV	Q A Q	RG	EQR	DPG	ЕТ	۷.					:	S <mark>G D</mark>	DI	VМ	ΙT	КD	N P	QT	I P T	YTD	ΙL	н	
Bos taurus	<u>гиики</u>	RALR	A <mark>k p k</mark>	V Y I V	/ Q A (CRG	EQR	DPG	ΕP	۷.					1	r <mark>g</mark> g	ΗL	VМ	ΙT	ΕN	ΤP	ET	I P T	YTD	ΤL	н	
Sorex araneus	<u> и и к и (</u>	EALR	3 <mark>k p k</mark>	VYII	QAO	RG	EQR	DPG	ETI	м.					(GD	ΚI	ΜM	VΤ	KD	S A	QT	I P T	YTD	AL	Н	
Rattus norvegicus	<mark>L N N K N (</mark>	K <mark>alr</mark> (Э <mark>крк</mark>	VYII	QAO	RG	EHR	DPG	ΕE	L -					1	P <mark>G D</mark>	ΕL	ΑV	ΙK	КK	N P	Ρ <mark>Τ</mark> Ι	I P T	YTD	ΜI	н	
Monodelphis domestica	L T N K N (RALR	3 <mark>K P K</mark>	VFIV	Q A O	C R G I	D <mark>Q</mark> K	DPG	ΕV	V K	ΡTS	SS-			(G D		V L	LΑ	K E	r p	ΡKJ	L <mark>P T</mark>	FSD	SL	н	

Figure 10. Alignement de séquence des pro-caspases 14 connues.

Seules les portions de l'extrémité C-ter de la grande sous-unité p20, la zone de clivage ainsi que la partie Nter de la petite sous-unité sont représentées. Les résidus les résidus les plus au moins conservé entre les espèces sont surlignées respectivement en orange et jaune. Le motif catalytique QACRG commun au Caspases est bien retrouvé dans les séquences des pro-Caspase-14 (cadre vert). Le motif hydrophobe conservé (cadre rouge) est bien conservé entre les différentes espèces. Le site de clivage de la pro-caspase-14 humaine est indiqué par une flèche rouge (Denecker G. *et al.,* 2008).

Un mécanisme d'activation en deux étapes a pu être proposé par Mikolajczyk J. *et al.*, en 2004 où la CASP-14 serait d'abord synthétisée comme monomère inactif dans la cellule, contrairement aux Caspases exécutrices. Puis, un clivage protéolytique par une *Elastase-like* au niveau d'un résidu Isoleucine entre les sous-unités p20-p10 permettrait de générer une forme capable de se dimériser et d'ordonner son site actif, dans une dernière étape d'activation. Il est également probable que ces évènements ne soient pas suffisants pour l'activation sachant qu'*in vitro*, l'ajout d'agent cosmotropiques tels que du citrate de sodium/ammonium, ou du sulfate de sodium/ammonium à de fortes concentrations (1 M) semble être indispensable. Une hypothèse pour l'activation totale de l'enzyme serait que durant les processus impliquant la CASP-14 active, à savoir la différenciation des kératinocyte, l'environnement cellulaire puisse changer pour favoriser l'activation par un mécanisme de désolvatation.

1.5. Activation des caspases initiatrices par des agents cosmotropiques *in vitro*

L'activité des protéases peut être considérablement augmentée *in vitro* par la présence de sels qui permettent d'ordonner la structure des protéines, ces sels sont des agents cosmotropiques.

Lorsque l'activité des caspases initiatrices est étudiée *in vitro* il est difficile d'estimer la concentration exacte en forme active dans un tampon classique. En effet, pour les CASP-8 et -9 les K_D étant très élevés (100 et 50 μ M) il y a donc un équilibre entre les formes monomériques et dimériques que l'on ne peut pas contrôler. Pour s'affranchir de ces paramètres deux groupes (Boatright K.M. *et al.*, 2003 ; Pop C. et al., 2008) ont développé des

tampons permettant une activité maximale des enzymes recombinantes -8, -9 et -10 avec des sels.

Ces agents permettent de stabiliser une protéine dans un environnement aqueux. Ils agissent en ordonnant la structure des molécules d'eau ou en palliant la perte de liaisons hydrogènes pour les protéines à fortes concentrations en sel, leur but est d'ordonner en diminuant l'entropie. À de fortes concentrations allant de 0,5 à 1,5 M les agents cosmotropiques peuvent avoir deux effets. D'une part, permettre aux monomères de passer une barrière entropique pour favoriser la forme dimérique, barrière naturellement levée *in vivo* par un recrutement des zymogènes au niveau de plateformes d'activation, dans le cas des CASP-8 et -9. D'autre part, ils peuvent favoriser l'organisation des boucles au niveau du site actif pour améliorer la fixation du substrat augmentant alors l'affinité de l'enzyme pour son substrat, c'est-à-dire en diminuant le K_M.

Peter D. Mace et ses collègues en 2014, ont ainsi pu démontrer que pour des monomères purifiés de CASP-8, -9 et -10 l'activation est 100 fois supérieure en présence d'1 M de citrate de sodium. En revanche, pour les Caspases exécutrices qui existent sous forme de dimères en solution, la stabilisation des boucles au niveau du site actif a un effet modéré, avec une activité 2 à 3 fois augmentée. Ils ont également pu observer que le succinate, le malonate ainsi que l'acide malique pouvaient efficacement activer les Caspases initiatrices.

Pour la CASP-8 l'agent optimal est le citrate de sodium tandis que la CASP-9 est plus active en présence de citrate d'ammonium. Pour la CASP-14, l'activité est induite en présence de 1,1 M de citrate de sodium (Mikolajczyk J. *et al.,* 2004).

2. Mécanismes catalytiques des Caspases : Catalyse et spécificité

Le site actif des protéases est composé d'un grand nombre d'acides aminés impliqués dans la catalyse. Ces derniers, assurent le bon alignement du substrat et permettent la catalyse en favorisant la stabilisation de l'état de transition. Le site actif est divisé en soussites ou poches (**Figure 1**) où chacun assure la fixation d'un résidu du substrat grâce à des interactions multiples. Ces interactions entre chaînes latérale spécifiques conditionnent la reconnaissance et la spécificité de substrat et sont également cruciales pour la catalyse. Comme toutes les protéases à Cystéine, les caspases utilisent une dyade catalytique Cystéine (-285) – Histidine (-237). Leurs sites actifs possèdent une topologie très conservée avec la Cys-

285 incluse dans motif peptidique QACXG (où X : R, Q ou G) lui-même hautement conservé (**Figure 11C**) (Nicholson DW *et al.,* 1999 ; Stennicke H.R. *et al.,* 1999).

2.1. Structure et Organisation générale

Les caspases matures sont des dimères d'hétérodimères, qui contiennent deux copies de larges et de petites sous-unités organisées dans une configuration dite « LSSL » où le L représente la grande sous-unité, p20, tandis que le S représente la petite sous-unité p10 (MacKenzie S.H. *et al.*, 2012). Chaque monomère ou domaine catalytique, est composé d'un feuillet bêta (6 brins par feuillet, β 1- β 6) parallèle et de cinq hélices alpha qui sont distribuées au-dessus et en-dessous du plan du feuillet (**Figure 11B**). Deux monomères s'associent par l'alignement antiparallèle des extrémités C-terminales des brins β 6 et β 6'- L'annotation « ' » faisant référence à la contribution du second monomère - qui génère un feuillet β continu composé de 12 brins, formant alors un dimère en structure tête-bêche, positionnant ainsi les deux sites actifs, apportés par chaque monomère, aux extrémités opposées de la protéine. (**Figure 11A**) (Aravind L. *et al.*, 2002).

Le site actif des Caspases localisé en surface, est formé par 5 boucles, 4 d'entre elles (L1-L4) sont la contribution du premier monomère tandis que la cinquième L2' est apportée par le second monomère. La taille et la topologie des boucles L1 et L3 sont fortement conservées tandis que L2 et L4 présentent un fort degré de variabilité entre Caspases. La boucle L1 et une partie de la boucle L2 contiennent la Cystéine catalytique et sont hébergées dans la grande sous-unité tandis que les boucles L3 et L4 proviennent de la petite sous-unité. (**Figure 11C**). En d'autres termes, les résidus impliqués dans la catalyse sont localisés dans la grande sous-unité p20 tandis que les résidus qui forment le sous-site S1 dérivent des grande et petite (p10) sous-unités. De même, les grandes et petites sous-unités apportent les résidus qui forment le sillon de liaison du substrat (S1-S4) bien que les déterminant majeurs de la spécificité de substrat soient localisés dans la petite sous-unité (Shi Y. 2002 ; Fuentes Prior P. *et al.*, 2004 ; Degterev A. *et al.*, 2003).



Figure 11. Structure générale et alignement de séquences des Caspases humaines.

(A) Structure en représentation ruban de la CASP-8 liée au peptide inhibiteur Ac-IETD-CHO en représentation bâtonnet (code PDB :1QTN) qui exemplifie le repliement commun aux à toutes les Caspases. La structure s'organise en un large feuillet β de 12 brins, « pris en sandwich » par deux couches d'hélices α . La clé catalytique est formée par l'assemblage des boucles L1-L4 qui forme le faisceau de boucle dans sa conformation active. (B) Diagramme topologique du domaine catalytique des Caspases. La position des résidus catalytiques Cys-285 et His-237 (rouge) ainsi que des résidus Arg-179 et Arg 341, impliqués dans la spécificité de substrat, est indiquée. La localisation des boucles contenant les éléments fonctionnels importants sont indiquée en bleu. En rouge sont représentées les hélices α au-dessus du feuillet tandis que celles en dessous sont représentées en vert. Les « dessus-dessous » se réfèrent à l'orientation standard des caspases, représentée en (A). La numérotation utilisée est celle utilisée par convention à partir de la CASP-1. (C) (Fuentes Prior P. *et al.*, 2004).

2.2. Architecture du site actif

2.2.1. Généralités

Le site actif des enzymes est classiquement localisé sur une zone dite de « *switch point* » proche de l'extrémité C-terminale d'un feuillet β central, dans lequel les boucles issues de deux brins β adjacents lient respectivement, l'un à une hélice α localisée au-dessus du plan du feuillet et l'autre à une hélice α en-dessous du plan. Le site catalytique des Caspases suit cette topologie, avec l'His-237 localisée sur la boucle β 3- α 3, qui lie le brin β 3 à l'hélice α 3 du dessus du plan, tandis que le brin β 1 adjacent est suivi de l'hélice α 1, localisée en-dessous du feuillet. La boucle β 1- α 1 abrite l'un des résidus impliqués dans la reconnaissance du résidu en

P1 du substrat, l'Arginine-179 (Arg-179). Bien que moins évidente, la localisation de la Cys-285 respecte également cette position « *switch point* », puisqu'elle est localisée sur la boucle très variable, ou *linker*, qui lie la grande et la petite sous-unité, au niveau des brins β 4- β 5 (**Figures 11B, C**). Cette boucle issue du brin β 4, qui se termine par la Glutamine-283 (Gln-283) très conservée, impliquée dans la liaison du substrat en P1, pointe vers la couche d'hélices α supérieure, tandis que la boucle provenant du brin β 5 mène à l'hélice α 4 localisée en dessous du feuillet. Enfin, la boucle β 5- α 4 contient également la seconde Arginine, Arg-341, impliquée dans la liaison du substrat en P1 (Walker N.P. *et al.*, ; Wilson K.P. *et al.*, 1994).

2.2.2. Sous-sites de reconnaissance

Chez les Caspases, la catalyse est gouvernée par la Cys-285 mais aussi par une spécificité stricte de clivage en C-terminal d'un résidu Aspartate. Cette spécificité rare parmi les protéases n'est partagée qu'avec la protéase à Sérine, Granzyme B. Le site actif des Caspases consiste en des sous-sites, ou poches, S5-S4-S3-S2-S1-S1' qui lient respectivement les résidus P5-P4-P3-P2-P1-P1' du substrat. La spécificité de reconnaissance est majoritairement conférée par les quatre acides aminés en N-terminal de la liaison scissile (P4-P3-P2-P1) (**Figure 12**) (Nicholson D.W. et al., 1999 ; Stennicke H.R. *et al.*, 2000 ; Degterev A. *et al.*, 2003 ; Fuentes Prior P. *et al.*, 2004 ; Poreba M. *et al.*, 2013).

2.2.2.1. Sous-site S1

Le sous-site S1, étroit et profond qui accommode le résidu en P1 est formé par les boucles L1, L2 et L3. Ce sous site S1, quasiment identique entre Caspases est formé par les chaînes latérales des résidus très conservés : Arg-179, Arg-341 et Gln-283. La géométrie très restrictive de cette poche profonde, étroite et basique est parfaitement adaptée à la fixation d'un Aspartate, expliquant cette spécificité très singulière des Caspases (Stennicke H.R. *et al.,* 2000). La constante k_{cat}/K_M permet à la fois d'apprécier à la fois la spécificité de reconnaissance et l'efficacité catalytique, aussi, plus la valeur de ce rapport est élevée plus la catalyse est efficace. Par ailleurs, pour les Caspases, la comparaison de ce ratio pour un substrat avec un Aspartate/Glutamate en P1 est d'environ 20.000, ce qui signifie que la présence d'un Glutamate dans ce sous-site est défavorable aussi bien pour la fixation à l'enzyme que pour la catalyse. L'exception est faite chez l'homologue Dronc, chez *Drosophilia m.*, qui semble reconnaître et cliver après les deux résidus.

2.2.2.2. Sous-site S2

Puisque la chaîne latérale du résidu accommodé en P2 pointe vers l'extérieur du site actif, et se retrouve exposée au solvant, de nombreux résidus peuvent être accueillis au niveau de ce sous-site S2, bien que celui-ci soit aussi impliqué dans la spécificité de liaison. Notamment, le sous-sites S2 des CASP-3 et -7 est formé par les résidus Tyr-338, Trp-340 et Phe-381 et accommode préférentiellement de petits résidus aliphatiques en P2, tels que : Alanine ou Valine. En revanche, pour les Caspases inflammatoires et initiatrices, le sous-site S2 est plus large avec une substitution de la Tyr-338 par une Valine, ou Alanine pour la CASP-2. En conséquence, elles vont pouvoir tolérer des résidus plus encombrant en P2 (Degterev A. *et al.,* 2003 ; Thorberry N.A. et al., 1997).

2.2.2.3. Sous-site S3

Dans ce sous-site, il y a fixation préférentielle d'un Glutamate chez toutes les Caspases. Ce dernier interagit avec les chaînes latérales des résidus Arg-341 et Arg-177 en plus chez la CASP-8. Ainsi, l'Arg-341 joue un double rôle dans l'ancrage du substrat au niveau du site actif puisqu'en plus de son rôle dans le sous-site S1, elle est aussi engagée dans la fixation du résidu en P3, *via* l'interaction de son guanidium avec le carboxylate du Glutamate. Ceci explique la préférence pour ce résidu au niveau de cette poche. Cette interaction au niveau du sous-site S2 contribue au bon positionnement du substrat. De plus, la Ser-239, conservée dans la majorité des caspases (**Figure 11C**), et Arg-341 coordonnent les groupements amino- et carboxy- des liaisons formées au niveau de P1 et P3.

2.2.2.4. Sous-site S4

Alors que le sous-site S1 distingue les Caspases des autres protéases, le sous-site S4, formé par la boucle L4 de la petite sous-unité p10, est déterminant dans la spécificité de reconnaissance des substrats entre les Caspases. En effet, la CASP-1 inflammatoire, possède un sous-site S4 étendu, hydrophobe et peu profond, qui accommode des résidus encombrants hydrophobes tels que Trp ou Tyr. Ces informations sont également applicables aux CASP-4 et -5.

Les Caspases apoptotiques possèdent un Tryptophane (Trp-348) relativement conservé (**Figure 12C**) contrairement au résidu Ile/Val présents chez les CASP-1, -4 et -5, réduisant ainsi considérablement la taille de la poche S4. Pour les CASP-6, -8, -9 et -10, le noyau indole de ce résidu contribue à la reconnaissance de petits résidus aliphatiques en P4, par contacts de Van

der Waals ainsi que par établissement de liaisons hydrogènes avec le carboxylate du résidu en P4. Pour les CASP-2, -3 et -8, un résidu Aspartate peut également occuper cette poche par des interactions avec les carboxamides de l'Asparagine-342 ou par interaction avec la Glutamine-381 pour la CASP-7. D'ailleurs, les CASP-3 et -7 présentent un sous-site étroit et bien défini qui enveloppe préférentiellement un Aspartate. La structure de leurs poches est conférée par un Trp-348 ainsi que par la structure de la boucle L4 qui fait un coude inversé irrégulier au-dessus du site actif. Les CASP-8 et -9 qui possèdent un sous-site de taille intermédiaire, montrent une préférence pour de petits résidus hydrophobes (Val, Leu) stabilisés par des contacts hydrophobes avec la chaîne aromatique de Tyr-340.

2.2.2.5. Sous-site S5

Parmi les Caspases, la CASP-2 est la seule qui requiert la reconnaissance d'un résidu en P5 pour une catalyse efficace. En effet, la présence d'un résidu dans cette poche S5 augmente de 35 fois l'activité catalytique. Cette particularité de la CASP-2 serait liée à l'agencement des résidus au niveau du sillon du site actif ainsi que la structure des boucles autour du site catalytique. Cette spécificité s'explique par la conformation fermée du sous-site S5 tandis que la région correspondante chez les autre Caspases présente une forme ouverte et davantage accessible au solvant (Schweizer A. *et al.,* 2003).

2.2.2.6. Sous-site P1'

Ce site bien que moins restrictif que les sous-sites S1-S4, tolère les petits résidus tels que : Gly, Ala et Ser, ainsi que des chaînes aromatiques encombrantes (Phe/Tyr). En revanche, il exclut les résidus polaires ainsi que la Proline.



Figure 12. Topologies du site actif des caspases humaines.

(A) Par convention, les résidus du substrat dans le site actif sont nommés à partir du résidu N-terminal de la liaison scissile (flèche jaune) P1 et celui du côté C-terminal, P1'. Les autres résidus (représentés en vert) sont nommés consécutivement à partir de ces résidus. Chaque résidu du substrat occupe une poche spécifique au niveau de l'enzymes, noté S (représenté en bleu). Chaque sous-site est composé de chaînes latérales d'acides aminé de l'enzyme ainsi chaque sous-sites de l'enzyme (S5-S1') reconnait un résidu (P5-P1') (Poręba M. *et al.*, 2013). (B) Représentation des liaisons hydrogènes et interactions de Van der Waals de l'inhibiteur Ac-DEVD-CHO lié aux sous-sites du site actif de la CASP-1. (Wei Y. *et al.*, 2000) (C) et (D) Comparaison des sites actifs des Caspases-2 et -3 liées respectivement aux peptides aldéhydes Ac-LDESD-CHO et Ac-DEVD-CHO. Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés.

2.3. Spécificité de substrat

Afin de mieux appréhender le rôle et de caractériser les spécificités de substrats des Caspases, l'équipe de N. Thornberry et ses collègues en 1997 ont développé une méthode combinatoire *in vitro* leur permettant d'obtenir une librairie de substrats liés à un fluorochrome, rapporteur de l'activité. Ils ont ainsi obtenu une librairie de 24000 molécules substrats ou PS-SCL (Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library) avec la structure générale Acetyl(Ac)-XXXX-Asp- 7-amino-4-methylcoumarin ou AMC (où X est un mélange d'acides aminés). Le *design* de cette librairie s'appuie sur les différentes propriétés catalytiques des Caspases et notamment sur leur spécificité stricte de clivage après un Aspartate ainsi que leur habilité à reconnaître et à cliver efficacement des tétrapeptides. Leurs résultats ont permis de classer les Caspases en fonction des motifs préférentiellement reconnus. Elles sont ainsi divisées en trois groupes I, II, III. II est à noter que les spécificités

sont proches entre Caspases d'un même groupe. Les spécificités de clivage de chacune des Caspases sont représentées en **Figure 13**.

Les membres du groupe I qui comprend les CASP-1, -4 et -5 reconnaissent toutes un motif (W/L)EHD. En revanche, le motif préférentiellement reconnus par les Caspases du groupes II est une séquence DE(V/H)D, (où X = V/H), ce groupe rassemble les CASP-2, -3 et -7. Les similitudes sont frappantes entre les CASP-3 et -7 puisque leurs profils de spécificités sont quasiment identiques. Enfin le groupe III regroupe les CASP-6, -8, -9 et -10 qui reconnaissent préférentiellement une séquence (L/V)EXD.

Ces résultats renforcent le fait que la position P4 est déterminante pour attribuer une sélectivité entre membres. En effet, les Caspases du groupe I peuvent, à cette position, accommoder un résidu aromatique/hydrophobe encombrant tandis que le groupe II ne reconnait qu'un Aspartate. Les Caspases du groupe III tolèrent plusieurs acides aminés mais préfèrent les longues chaînes aliphatiques. En position P3 toutes les Caspases préfèrent un Glutamate (E). Enfin, toutes les substitutions sont tolérées en P2, excepté pour la CASP-9 qui ne reconnaît qu'une Histidine. Par ailleurs, à cette position les Caspases du groupe II ont une préférence pour des résidus hydrophobes (Rano T.A. *et al.,* 1997)

Dans le but d'identifier des substrats de la CASP-2, en se basant sur des sites de clivage contenus dans les séquences des Caspases et de leurs substrats, une étude menée par R.V Talanian en 1997 a mis en évidence que seules les séquences VDQQD localisée sur la protéase (résidus : 312-316) et LDVVD sur la CASP-6 (résidus : 175-179) étaient clivées par la CASP-2. Ainsi, en examinant la dépendance de la taille du peptide substrat par rapport sur l'efficacité catalytique, ils ont pu démontrer que la CASP-2 nécessite la reconnaissance d'un résidu en P5 pour cliver efficacement. Comme les CASP-3 et -7,la CASP-2 préfère un Aspartate ainsi qu'une Valine et une Alanine en positions P3, P2 respectivement. Cette dernière clive donc efficacement un motif VDVAD. Pour les autres Caspases du même groupe cette dépendance du résidu en P5 ne s'applique pas mais n'affecte toutefois pas l'efficacité de clivage. En utilisant la librairie PS-SCL, il a pu être démontré que la Caspases inflammatoires, dans le groupe I (Mikolajczyk J. *et al.*, 2004).



Figure 13. Spécificité de substrat des Caspases humaines.

Cette classification se base sur la spécificité stricte de clivage après un résidu Aspartate en P1 ainsi que par leur habilité à reconnaître et à cliver efficacement des tétrapeptides. À partir de ces critères, les Caspases sont réparties en trois groupes, le groupe I qui contient les Caspases inflammatoires ainsi que la CASP-14, reconnait un motif générique (W/L)EHD, les Caspases-2, -3 et -7 constituent le groupe II et reconnaissent préférentiellement un motif DE(V/H)D et enfin les Caspases du groupe III qui regroupe les Caspases-6, -8 et -9 ont une préférence pour une séquence tétrapeptidique (L/V)EXD. Parmi les Caspases, la -2 est particulière puisqu'elle nécessite la reconnaissance d'un résidu en P5 pour cliver efficacement. Cette classification en trois groupes suggère des fonctions redondantes entre Caspases. Les ordonnées représentent le ratio d'AMC libéré, exprimé en pourcentage du ratio maximum observé dans chaque expérience. En abscisses sont représentés la position des différents acides aminés avec le code à une lettre. D'après Thornberry N.A. *et al.*, ; Talanian R.V. *et al.*, 1997.

2.4. Mécanisme catalytique

Dans le site actif des Caspases, la Cys-285 et l'His-237 constituent la dyade catalytique. Plus précisémeent, Cys-285 agit comme nucléophile tandis que l'His-237 a un rôle dual. En effet, cette dernière joue le rôle de base générale en captant le proton du groupement thiol de la Cys-285 pour constituer son pouvoir nucléophile. Puis, elle joue le rôle d'acide général en permettant la protonation de l' α -amino groupe du résidu en P1' afin d'empêcher la reformation de la liaison peptidique. Cette particularité des protéases à Cystéines tient compte de la réactivité du thioester (P1~CO-S-Cys-285) et de sa susceptibilité aux attaques nucléophiles. Par conséquent, si le groupe α -amino n'est pas protoné, la reformation de la

liaison peptidique sera favorisée par rapport au départ du groupe partant, empêchant ainsi la protéolyse. Il est à noter que 5,2 Å séparent la Cys-285 de l'His-237, ceci remet en cause le fait que la cystéine soit pré-polarisée en amont de la catalyse et tendrait plutôt vers un nucléophile qui se développerait au cours de la réaction. Cette hypothèse est en accord avec le pH optimal des Caspases qui se situe entre 6.4 et 7.4 (pKa_{Cys} = 8,4).

La catalyse, qui suit les étapes indiquées en Figure 14, débute par une étape d'acylation (1°) où l'oxygène du carbonyle du résidu en P1 est ancré dans le trou oxyanion, composé de Cys-285 et de la Glycine 238 (Gly-283). L'établissement de liaisons hydrogènes entre l'oxygène du carbonyle et les azotes de Gly-238 et Cyst-285, permet la polarisation de la liaison C-O du carbonyle pour faciliter l'attaque nucléophile par le groupement thiol de la Cys-285 catalytique au niveau du carbone du carbonyle rendu hautement électrophile. Cette attaque donne lieu à la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique hautement énergétique. Avant ou pendant la l'attaque nucléophile le groupement thiol de la cystéine 285 donne un proton à l'His-237 afin qu'elle puisse ensuite agir en acide général en venant protoner l' α amino groupe du résidu en P1'. Ensuite, au cours de l'étape de « déacylation », l'His-237 déprotonée va activer une molécule d'eau en captant un proton pour permettre l'attaque de la liaison thioester (3°). L'attaque de l'hydroxyle sur le carbone du carbonyle résulte en la formation d'un deuxième intermédiaire tétraédrique. Enfin, la rupture de la liaison Sy - C permet la régénération de l'enzyme (5°) (Stenncikes H.R. et al., 1999 ; Fuentes Prior P. et al., 2004). Chez de nombreuses protéases un troisième résidu intervient pour faciliter la catalyse. Chez les Caspases ce troisième élément n'est pas un résidu mais serait plutôt l'oxygène du carbonyle de la chaîne peptidique au niveau du résidu 177. Cet oxygène permettrait de modifier la basicité du noyau imidazole de l'His-237 et/ou de l'orienter pour faciliter la catalyse par l'établissement d'une liaison hydrogène avec le résidu catalytique.



Figure 14.Mécanisme catalytique des Caspases.Les étapes de la Catalyse sont détaillées dans le paragraphe *ci-dessus* (Fuentes Prior P. *et al.,* 2004).

II. Les Caspases, Rôles biologiques

Les Caspases sont connues pour leurs implications majeures dans l'initiation et la propagation de signaux responsables de la mort cellulaire programmée par apoptose régit par les Caspases apoptotiques (initiation et exécution) d'une part, et de l'inflammation et de la mort par pyroptose exécutée par les Caspases inflammatoires d'autres part. Régulatrices clés de ces deux processus majeurs, elles jouent également un rôle dans la différenciation des kératinocytes ainsi que dans de nombreux autres processus biologiques (Mcllwain D.R. *et al.*, 2013). Dans ce chapitre seront développées les rôles physiologiques des Caspases dont les mécanismes d'activation ont été présentés dans la partie précédente.

A. Caspases : Régulateurs majeurs de l'Apoptose et de l'inflammation

1. Les différents types de mort cellulaires

La mort cellulaire se manifeste par des altérations morphologiques. Basés sur la morphologie et les mécanismes trois types de mort cellulaires régulées ou RCD pour *Regulated Cell Death*, sont définis. La mort de type I ou apoptose est caractérisée par une contraction du cytoplasme, une condensation de la chromatine (pyknosis), une fragmentation nucléaire (karyorrhexis) ainsi la formation de protubérances de la membrane plasmique qui précède la formation de petites vésicules communément appelées corps apoptotiques. Ces derniers, sont rapidement éliminés au niveau des lysosomes par des macrophages ou d'autres cellules dotées d'activité phagocytaires. La mort de type II ou mort autophagique se manifeste par une vacuolisation cytoplasmique et s'achève par phagocytose et dégradation au niveau des lysosomes. Enfin, la mort de type III ou nécrose ne présente aucune des caractéristiques des morts de type I et II, et est caractérisée par une perméabilisation de la membrane plasmique et s'achève par l'élimination des restes cellulaires sans phagocytose ni dégradation lysosomale (Schweichel J.U. *et al.*, 1973 ; Galluzzi L. *et al.*, 2018).

2. Caspases et Apoptose

Le terme « apoptose » fut introduit en 1972 par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Currie, afin de décrire une morphologie bien distincte de mort cellulaire qui s'effectue selon des modalités génétiquement programmées (Kerr J.F. *et al.,* 1972). Présent chez les tous les Eucaryotes, ce processus physiologique est indispensable à la survie et au bon développement d'un organisme pluricellulaire puisqu'il est aussi bien impliqué dans le développement postnatal que dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte.

Chez les mammifères l'apoptose est majoritairement initiée par deux voies ; La voie dite « extrinsèque » qui est déclenchée par l'activation des récepteurs de mort (Fas, TRAIL-R ou TNFR1) et qui implique la formation d'une plateforme d'activation des Caspases, le DISC (Ashkenazi A. *et al.*, 1998); Ainsi que par la voie « intrinsèque » ou voie mitochondriale, initiée par un stress cellulaire qui se traduit par une perte de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale qui permet la relocalisation de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytosol (Adams J.M. *et al.*, 1998). Parmi ces facteurs, le cytochrome *c* détermine la mise en place de l'Apoptosome. Ces deux voies convergent vers l'activation des Caspases exécutrices et mènent au clivage de protéines cibles qui conduisent à la mort cellulaire (Degterev A. *et al.*, 2003 ; McIlwain D.R. *et al.*, 2013 ; Parrish A.B. *et al.*, 2013 ; Galluzzi L. *et al.*, 2018).

2.1. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

La voie intrinsèque de l'apoptose est une forme de mort cellulaire régulée initiée par une grande variété de stress cellulaires qui incluent : la privation en facteur de croissance, les dommages de l'ADN et du cytosquelette, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS), ainsi que de nombreux autres facteurs tels que des hormones, notamment au cours du développement. La CASP-9 execute cette voie intrinsèque de l'apoptose. La voie intrinsèque est régie par des évènement de perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM), en particlulier de la membrane externe - PMEM, ce qui lui vaut le nom de voie mitochondriale. La MMP est contrôlée par les membres pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (B-cell *lymphoma-2*) qui sont un groupe de protéines qui partagent un à quatre domaines BH pour BCL-2 homology (i.e : BH1, BH2, BH3 et BH4) (Czabotard P.E. et al., 2014). En réponse à des stimuli apoptotiques, MOMP est médiée par BCL-2 associated X, BAX, et/ou BCL-2 antagonist/killer 1, BAK. Ces deux régulateurs apoptotiques sont formés de quatre domaines BH et d'un domaine transmembranaire (α 9) en C-ter, conservé. Avec un autre régulateur de la famille (BOK), BAX et BAK sont les seuls membres de la famille BCL-2 à être capable de former des pores à travers la membrane externe mitochondriale -MEM- dans les cellules de mammifères.

Le modèle actuellement proposé pour la formation du pore à travers la membrane se décline en deux étapes majeures, illustrée pour BAX en **Figure 15**. Suite à un stimulus apoptotique BAX est transloqué et s'ancre au niveau de la MEM par son hélice α 9 où il

demeure dans une configuration repliée, avec son domaine BH3 (α 2) et un domaine dit « loquet » (α 6- α 8), repliés sur le domaine central de BAX, composé des hélices α 1- α 5. Suite au signal apoptotique, d'autres membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2, qui ne possèdent qu'un seul domaine BH (BH3), tels que BIM (*Bcl-2-like protein 11*) et BID (*BH3 interacting-domain death agonist*) sont transloquées au niveau de la MEM et vont activer BAX en insérant leurs domaines BH3 dans le domaine central de BAX, permettant ainsi la libération de ce domaine par déplacement du loquet et déplacement de son domaine BH3. Libéré, BH3 peut ensuite se fixer et libérer le domaine central d'une autre protéine BAX, favorisant la formation d'un dimère symétrique (Czabotar P.E. et al., 2013). Cette dernière étape permet l'oligomérisation des domaines centraux de BAX pour conduire à l'assemblage d'une pore lipidique toroïdal entraînant une perméabilisation de la MEM ainsi qu'un réarrangement de de la structure mitochondriale (Salvador-Gallego R. et al., 2016). Les interactions de BAK avec les activateurs BIM et BID ainsi que les modalités d'activation de BAX sont semblables au modèle de BAX.





Pour les détails de l'activation se référer au texte *ci-dessus*. Czabotar P.E. *et al.*, 2013

La PMEM conduit à la libération de facteurs apoptogènes résidant normalement dans l'espèce inter membranaire de la mitochondrie (Tait S.W. *et al.*, 2010). Ces protéines libérées dans le cytosol incluent, SMAC/DIABLO pour *Second Mitochondrial Activators of Caspases* ainsi que le cytochrome *c*, qui agit habituellement en transporteur d'électron dans la chaîne respiratoire. Le *pool* cytosolique de Cyc *c* se lie à Apaf-1 et permet la formation de l'Apoptosome en présence de dATP pour conduire à l'activation de CASP-9 (**Figure 16**). CASP-9 active peut alors catalyser l'activation protéolytique des Caspases exécutrices, -3 et -7 qui vont conduire à la mort cellulaire et être responsable des changements morphologique et biochimique inhérent à la mort par apoptose (*i.e.* : fragmentation de l'ADN, exposition des phosphatidylsérines (PS) (Martin S.J. *et al.*, 1996), formation des corps apoptotiques). En effet,

CASP-3 favorise la fragmentation de l'ADN en inactivant, par clivage protéolytique, la sousunité α du facteur de fragmentation de l'ADN, DFFA ou ICAD, libérant ainsi DFFB ou CAD pour induire la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Enari M. *et al.*, 1998). CASP-3 est également capable d'entraîner l'exposition des PS, normalement exposées sur le feuillet interne de la membrane plasmique, sur le feuillet externe en activant des protéines impliquées dans l'externalisation des PS, telles que les Scramblases, ou en inactivant des enzymes responsables de l'internalisation des PS telles que les Flipases. CASP-3 clive également PARP1 (Poly ADP-ribose polymerase 1) qui est responsable, en condition physiologique, de la réparation de l'ADN suite à des dommages. Le clivage de ROCK1 (Rhoassociated kinase 1) par CASP-3 permet la libération d'un fragment N-ter actif qui peut alors phosphoryler la chaîne régulatrice légère de la myosine pour permettre la formation des boursouflures de la membrane plasmique (Sebbagh M. *et al.*, 2001 ; Bulat N. *et al.*, 2009).

En parallèle, SMAC/DIABLO renforce l'activité Caspases en s'associant aux IAPs (inhibitor of apoptosis protein) dont XIAPs (X-linked IAP) qui inhibe l'activité des Caspases (Figure 16).



Figure 16. Exécution de l'apoptose par l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Les mécanismes de ces deux voies de mort sont détaillés en partie 1.1 et 1.2. (Ashkenazi A. *et al.*, 2014)

2.2. Voie extrinsèque : Caspases-8 et -10

L'apoptose par voie extrinsèque est initiée par une famille de récepteurs, appelés « récepteurs de mort », situés au niveau de la membrane plasmique. La fixation d'un ligand extracellulaire sur un récepteur de mort transmembranaire, conduit à une oligomérisation de ce dernier. Six récepteurs de mort de la superfamille du TNF peuvent réguler directement ou indirectement l'apoptose ; TNFR1 ; Fas/CD95/APO1 ; DR3/APO3 (*Death Receptor 3*) ; DR4/TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1*) ; DR5/TRAIL-2 et DR6. Les ligands de ces récepteurs incluent respectivement le TNF α , CD95-L pour *CD95-Ligand* également appelé Fas-L, TL1A (*TNF-like ligand 1A* et TRAIL /Apo2-L qui se lie à DR4 et DR5. L'engagement du récepteur de mort, permet l'assemblage de complexes multiprotéiques dynamiques au niveau de la queue intracellulaire du récepteur, le DISC, complexe I et complexe II. Ces plateformes permettent alors de réguler l'activation et les fonctions des CASP-8 et CASP-10 (Ashkenazi A. *et al.*, 2014).

L'activation des récepteurs Fas, DR4 et DR5 transduit un signal intracellulaire qui conduit à la mort par apoptose. Fas, DR4 et DR5 déclenchent donc la cascade apoptotique par assemblage du DISC suite à la fixation de leur ligands homotrimériques pour permettre l'activation des CASP-8 et -10. L'exécution de l'apoptose consécutive à l'activation des récepteurs de mort suit deux parcours distincts. Dans les cellules de type I (thymocytes, lymphocyte mature), l'activation de CASP-3 et -7 par CASP-8 est suffisante pour induire la mort cellulaire (Barnhart B.C. *et al.*, 2003). En revanche, dans les cellules de type II (hépatocytes, cellules β du pancréas ainsi que la majorité des cellules cancéreuses) où l'activation des CASP-3 et CASP-7 est contrôlée par les inhibiteurs XIAPs, la poursuite du signal de mort nécessite un basculement vers la voie mitochondriale par l'intermédiaire du clivage de BID par CASP-8. La protéine résultante de ce clivage, tBID, est alors transloquée à la MEM où tBID active BAK ou BAX par liaison de son domaine BH3 au domaine central de BAX/BAK provoquant ainsi que la formation d'un pore au travers de la MEM pour permettre la libération de SMAC et du cytochrome *c* dans le cytoplasme. Enfin, l'assemblage de l'Apoptosome permet l'activation de CASP-9 qui va par la suite activer CASP-3 et CASP-7 (Li H. *et al.*, 1998).

Au même titre que Fas, DR4 et DR5, TNFR1 utilise également FADD et CASP-8 pour déclencher l'apoptose. Cependant, il engage ces médiateurs indirectement en induisant la formation d'un second complexe, dit Complexe II, qui se forme en aval du premier complexe, appelé Complexe I qui se forme au niveau de la membrane plasmique. Ce premier complexe,

transmet un signal qui peut conduire à trois voie distincte, une première voie qui conduit à la survie cellulaire par activation de la voie NF- κ B, une seconde qui mène à l'activation de CASP-8 par formation du Complexe II dans le cytoplasme et une troisième voie liée à la formation d'un autre complexe secondaire appelé Complexe IIb ou nécrosome qui entraîne une mort cellulaire par nécroptose, ici seule l'activation de l'apoptose nous intéresse (Ashkenazi A. *et al.,* 2014) (**Figure 16**).

Suite à une stimulation initiale, de nombreux composant du Complexe I et notamment RIPK1, est délocalisé dans le cytoplasme pour former le Complexe II où il recrute l'adaptateur FADD par interaction de leur DD, qui a son tour recrute et permet l'activation de CASP-8 pour transmettre le signal d'apoptose. La délocalisation de RIPK1 dans le cytoplasme nécessite, au niveau du Complexe I, une étape de déubiquitinylation par la déubiquitinase CYLD (*cylindromatosis*) (**Figure 16**).

3. Caspases et Inflammation

3.1. Les Caspases-1, -4, -5 et -11 : acteurs clés de l'immunité innée

La mise en évidence de l'implication des Caspases dans l'inflammation remonte à l'identification de la CASP-1 ou ICE comme enzyme capable de cliver la cytokine proIL-1 β en IL-1 β mature dans les macrophages (Thornberry N.A. *et al.,* 1992 ; Ramirez M.L.G. *et al.,* 2018). En effet, les souris constitutivement déficientes en CASP-1 semblent être résistantes aux chocs toxiques induit par un traitement au Lipopolysaccharide (LPS) (Kuida K et al., 1995).

La sous-famille des Caspases inflammatoires inclue également les CASP-4, -5 et 12 chez l'homme et les CASP-1, -11 et -12 chez la souris (Jiménez Fernández D *et al.*, 2015).

Les gènes codant les caspases inflammatoires sont organisés en *cluster* sur le chromosome 11q22, ce qui suggère qu'ils pourraient être issus d'une duplication de gène. De plus, l'analyse des séquences des gènes *CASP-4* et -5 suggère qu'elles proviennent d'une duplication d'un gène ancestral de CASP-11 *like*, la CASP-11 est donc un orthologue murin des CASP-4 et -5 (Martinon F. *et al.*, 2004).

L'activation des Caspases inflammatoires se met en place en réponse à des infections virales ou bactériennes, ainsi que suite à une exposition à des toxines, des métabolites et irritants environnementaux. L'activation de la CASP-1 se fait par oligomérisation au sein de structures macromoléculaires appelées inflammasomes. En revanche, les CASP-11/-4 et -5 peuvent être

activées indépendamment de la voie canonique de l'inflammasome en interagissant comme récepteur du lipopolysaccharide (LPS) (Shi J. *et al.,* 2014)

3.1.1. Caspases et voie canonique de l'inflammasome

NLRP1 fut le premier inflammasome décrit par Tschöpp et ses collègues en 2002 (Martinon F. et al., 2002). Dans leur étude, les auteurs ont montré que NLRP1 pouvait recruter la CASP-1 au niveau de son extrémité N-terminale PYD via l'adaptateur ASC tandis que la CASP-5 pouvait être directement recrutée par une interaction CARD:CARD. Toutefois, la CASP-5 ne semble pas être activée au sein de cette plateforme. La même équipe a par la suite pu identifier l'inflammasome NLRP3 comme étant l'une des causes d'une sécrétion anormalement élevée d'IL-1 β dans les macrophages de patient atteint du syndrome de Muckle Wells (Agostini L. et al., 2004). Ensuite, NLRC4 a été mis en évidence dans un modèle de macrophage déficient en NLRC4 où la CASP-1 n'était pas activée suite à une infection par Salmonella typhimurium (Mariathasan S. et al., 2004). En 2009 suite à trois études, AIM2 est décrit comme l'inflammasome activé suite à la fixation d'ADN double brin cytosolique. Aujourd'hui, c'est dix inflammasomes qui ont pu être identifiés : NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NAIP/NLRC4, NLRC5, AIM2, IFI16, Pyrin. Bien que ces complexes soient tous capables d'activer la CASP-1 en conditions physiologiques ou pathologiques, les processus régissant leur distribution dans les tissus ainsi que les modalités d'assemblage et de spécificité sont encore à élucider (Songane M. et al., 2018).

Les plateformes les mieux caractérisées pour l'activation de la CASP-1 sont : l'inflammasome NLRP1, qui s'active en réponse à la toxine « anthrax » sécrétée par une souche virulente de *Bacillus anthracis* ; l'inflammasome NLRP3, qui reconnaît une variété de PAMPs (nigéricine, ARN) mais aussi des champignons ; l'inflammasome NAIP/NLRC4 qui reconnaît les flagellines bactériennes et de nombreuses protéines sécrétées par les bactéries Gram – ; Puis, l'inflammasome AIM2, qui active la CASP-1 en réponse à de l'ADN double brin cytosolique de virus (vaccina, cytomégalovirus) notamment.

L'inflammasome NLRP1 peut recruter la CASP-5 en faisant intervenir une protéine adaptatrice CARDINAL qui va recruter la Caspase via une interaction CARD/CARD, cette dernière observation renforce l'hypothèse que plusieurs caspases inflammatoires peuvent agir de concert pour induire une meilleure réponse (Martinon F. *et al.,* 2004 et 2007 ; Fernández D.L. *et al.,* 2015).

La réponse immunitaire innée par la voie canonique de l'inflammasome dépend d'une première étape cruciale où la stimulation des TLRs permet l'activation au niveau transcriptionnel de NLRP3 et des cytokine pro-inflammatoires (IL-1 β et interféron, IFN) par le biais de la voie NF- κ B. Ensuite, suite à un second stimulus, généralement une déplétion en K⁺ ou la présence de PAMPs dans le cas de l'activation de NLRP3, le recrutement et l'activation de la CASP-1 par l'inflammasome permet l'activation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 pour faciliter leur sécrétion afin de promouvoir la réponse immunitaire (Galluzzi L. *et al.,* 2016).

3.1.2. Voie non canonique

Des études récentes suggèrent que les CASP-4, -5 et -11 pourrait participer à l'inflammation dans un processus d'activation non canonique qui ne dépend pas de la présence des partenaires protéique de l'inflammasome (Kayagaki N. *et al.,* 2011).

Le rôle de la CASP-11 dans la production d'IL-1 β suite à la présence de LPS intracellulaire a été mis en évidence à partir de 1998 où des souris CASP-11^{-/-} étaient résistantes aux chocs toxiques et ne produisaient pas d'IL-1 α et β en réponse à un stimulation au LPS (Wang S. *et al.*, 1998). Il a ensuite été proposé que les CASP-11, -4 et -5 puissent être des senseurs au LPS intracellulaire provenant des bactéries Gram « - » (Shi J. *et al.*, 2015 ; Galluzzi L. *et al.*, 2018). Par ailleurs, les CASP-4, -5 et -11 sont capables d'initier la pyroptose en présence de LPS dans le cytoplasme de monocytes aussi bien que dans d'autres types cellulaires (Songane M. *et al.*, 2018). Plus précisément, la portion lipidique du LPS ou le LPS entier serait capable d'interagir avec le domaine CARD des Caspases et cette interaction spécifique résulte en une oligomérisation suivi d'une activation des enzymes. Shi J. *et al.*, en 2015 ont pu montrer que ces trois Caspases étaient capables de former des multimères en présence de LPS, tandis qu'en absence de signaux elles demeuraient sous forme monomèrique.

3.1.3. Caspases, inflammation et pyroptose

3.1.3.1. Généralités sur la pyroptose

La pyroptose est une forme de mort cellulaire régulée, déclenchée par une perturbation de l'homéostasie extra ou intracellulaire liée à l'immunité innée et qui se manifeste par des changements morphologiques (Jorgensen I. *et al.,* 2015). Ces modifications structurales de la cellule inclues : i) une condensation particulière de la chromatine, différente de celle observée pour l'apoptose, ii) un gonflement de la cellule qui s'achève par iii) une

perméabilisation de la membrane. Initialement décrite en 1992, c'est en 2001 que le nom pyroptose est associé à ce processus par Cookson et Brennan, où *pyro* signifie le feu, en référence à la nature inflammatoire de cette forme de mort, et *ptosis*, la chute (Cookson B.T. *et al.*, 2001). La pyroptose implique les Caspases inflammatoires, notamment la CASP-1, mais elle peut aussi impliquer la CASP-3, elle peut également se dérouler dans d'autres types cellulaires que le lignage monocytaire. Enfin, Elle a un rôle majeur dans l'immunité innée en réponse à des pathogènes intracellulaires et elle est implqiuée dans des conditions pathologiques induite par le LPS (choc septique) (Aziz M. et al., 2014 ; Galluzzi L. *et al.*, 2018).

3.1.3.2. Caspases, inflammation et pyroptose

La CASP-1 joue un rôle central dans l'immunité innée en répondant aux signaux cytosoliques en initiant une double réponse impliquant le relargage de cytokine et/ou la mort par pyroptose. Le rôle de cette enzyme dans la mort cellulaire inflammatoire a été mise en évidence dans un modèle d'infection par Shigella flexneri où l'inhibition de la CASP-1 par un agent pharmacologique, l'YVAD-cmk, inhibait la libération d'IL-1 β ainsi que la mort cellulaire (Hilbi H. et al., 1997). Plus tard, en 2007, la séquence des événements menant à la pyroptose a été clarifiée (Fernandes-Alnemri T. et al., 2007). Dans leurs études, les auteurs ont alors montré que les activateurs de l'inflammasome induisaient l'assemblage d'un pyroptosome par cellule. Ce dernier permettant le recrutement et l'activation de la CASP-1 conduisant à la pyroptose et au relargage d'IL-1β. Mécanistiquement, les CASP-1 et -11 sont capable de cliver la Gasdermin D pour générer un fragment p30 actif N-terminal capable de former des pores de 10 à 33 nm à travers la membrane plasmique. Plus précisément, cette protéine de 480 acides aminés se divise en deux domaines : un domaine N-terminal, gasdermin-N, suivi d'une longue boucle qui lie un deuxième domaine, gasdermin-C, localisé en C-terminal. Cette dernière, en absence de signaux est maintenue inactive par repliement de gasdermin-C sur gasdermin-N. Les CASP-1 (humaine et murine) et -11 (murine) clivent efficacement GSDMD après un Aspartate (Asp-276, -275) au niveau de la longue boucle qui lie les deux domaines, d'ailleurs, les CASP-4 et -5 sont également capables de cliver GSDMD. Une fois clivée, un fragment p30 gasdermin-N actif est libéré et va se lier spécifiquement à des lipides de la membrane plasmique (phosphoinositides et cardiolipine). Cette interaction entraîne un oligomérisation de gasdermin-N et permet la formation d'un pore au travers de la membrane plasmique. Le pore ainsi formé perturbe le potentiel osmotique et induit un gonflement de la cellule aboutissant à une lyse (Figure 17) (Liu X. et al., 2016 ; Shi J. et al., 2017).



Figure 17. La CASP-1 est le médiateur central de la voie canonique de l'inflammasome. Chez la souris, la Casp-11 agit comme un senseur et est activée *via* une interaction avec du LPS, tout comme les CASP-4 et -5 chez l'homme. Les CASP-1 et -11 permettent toutes deux la maturation d'IL-1 β et d'IL-18, bien que CASP-11 ne soit pas capable de cliver directement. De plus, ces deux protéases sont capables de cliver et d'activer la Gasdermin D (GSMD) en une fragment N-ter capable de former un pore à travers la membrane pour conduire à la pyroptose. Il s'agit d'un type de mort inflammatoire qui participe activement à l'élimination des pathogène (Songane M. *et al.*, 2018)

B. Régulation de l'activité Caspase

Le premier niveau de régulation des Caspases implique la conversion des zymogènes catalytiquement inactifs en dimères actifs en réponse à des stimuli inflammatoires ou apoptotiques. Mais une grande variétés d'autres mécanismes de régulations sont mis en place par la cellule afin d'adapter au mieux la réponse en fonction du stimulus.

1. Régulation de l'activité des Caspases apoptotiques

1.1. Régulation post-traductionnelles

1.1.1. Caspases initiatrices

Compte tenu de ces rôles, la CASP-9 est soumise à un contrôle fin de son activité. Un certain nombre de site de régulation par phosphorylation ont été mis en évidence et résultent principalement en une réduction de l'activation de CASP-9, soit par contrôle de l'activation du zymogène soit *via* des modifications de la forme active (Allan L.A. *et al.,* 2003 et 2009).

D'ailleurs, la phosphorylation au niveau de Thr-125, par nombreuses Kinases telles que : Erk (Extracellular signal-regulated kinase) et cdk1/cyclin B (Cyclin-dependent kinase 1) localisée entre le domaine CARD et la large sous-unité, entraîne une réduction de son activation. Cette réduction se traduit donc par une diminution de l'activation de la CASP-3. Cependant, cette réaction peut être reversée par l'action de la protéine phosphatase-1 α (PP1 α). CASP-9 peut également être la cible de la protéine Kinase Cξ (PKCξ), dont la phosphorylation au niveau de Ser-144 en réponse à un choc osmotique abolit l'activité CASP-9 (Brady S. et al., 2005). En revanche, la phosphorylation de CASP-9 au site Tyr-153 par c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) suite à un dommage à l'ADN est connue pour stimuler l'activité CASP-9. CASP-9 peut également voir son activité modulée par nitrosylation, lorsque les taux de monoxyde d'azote (NO) sont élevés dans la cellule (Török N.J. et al., 2002). Enfin, un contrôle est exercé au niveau de sa stabilité, par des événements d'ubiquitinylation. En effet, CASP-9 peut être ubiquitinylée par XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un membre de la famille des IAPs, qui possède en C-ter de sa séquence, un domaine RING (Really Interesting New Gene) responsable de son activité ubiquitine ligase. Ainsi XIAP peut polyubiquitinyler la grande sous-unité de la CASP-9 active tout en étant inefficace sur le zymogène (Morizane Y. et al., 2005).

En tant que Caspase initiatrice majeure de la voie extrinsèque, CASP-8 joue un rôle essentiel dans la détermination du devenir de la cellule suite à l'activation des récepteurs de morts. Comme pc-9, pc-8 est également la cible de phosphorylations qui régulent son activation. Le complexe cdk1/cycline B phosphoryle la pc-8 au niveau de Ser-387 empêchant ainsi son activation (Matthess Y. *et al.*, 2010). La phosphorylation de CASP-8 par la p38 MAPK au niveau de Ser-364 inhibe la CASP-8 active et protège les neutrophiles d'une mort induite par l'engagement de la voie Fas (Alvarado-Krinstensson M. *et al.*, 2004). L'ubiquitinylation permet également de réguler l'activité de CASP-8 (Jin Z. *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'ubiquitinylation par Cullin-3 au niveau de la petite sous-unité, suite au recrutement de la CASP-8 au niveau du DISC, augmente l'activité enzymatique de CASP-8. Cette ubiquitinylation permet alors la fixation d'une protéine de liaison aux chaînes polyUb, p62. Cette dernière, facilite alors l'association avec d'autres complexes CASP-8/polyUb/p62, pour former des agrégats dans lesquels l'activité CASP-8 semble être augmentée de part une stabilisation des dimères. Enfin, NO semble également être impliqué dans la régulation de l'activité CASP-8, qui

entraîne une diminution de la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par le TNF- α (Kim Y.M. *et al.,* 2000).

1.1.2. Caspases exécutrices

CASP-3 est la Caspase exécutrice la mieux étudiée et partage certaines fonctions avec les CASP-6 et CASP-7. Bien qu'elle soit activée au cours des dernières étapes du processus de mort cellulaire, CASP-3 est également la cible de modification post-traductionnelles. D'ailleurs, comme CASP-8, CASP-3 est la cible de MAPK p38 qui phosphoryle la Ser-150 dans la grande sous-unité inhibant ainsi l'activité CASP-3 et diminuant la sensibilité des neutrophiles suite à l'engagement du récepteur de mort Fas (Alvarado-Krinstensson M. *et al.*, 2004). La protéine phosphatase 2A restore l'activité CASP-3 en déphosphorylant le site Ser-150 permettant alors de rétablir l'apoptose suite à la stimulation de Fas dans les neutrophiles. CASP-3 peut également être la cible de glutationylation, nitrosylations, de mono- ou poly-ubiquitinylation mais les données demeurent assez floues (Parrish A.B. *et al.*, 2013).

1.2. Régulation par interactions protéines/protéines

En plus des modifications post-traductionnelles, de nombreuses protéines, de par la nature des interactions, peuvent moduler l'activité des Caspases au cours de l'apoptose.

1.2.1. Régulation par les inhibiteurs endogènes

Un autre niveau de régulation implique une inhibition spécifique des Caspases par des inhibiteurs endogènes. Les *Inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs) régulent l'apoptose par une inhibition directe des Caspases.

Les gènes codant les IAPs ont été identifiés par Lois Miller et ses collègues chez le baculovirus puiqu'ils étaient capables de protéger les cellules infectées de la mort et parce qu'ils amélioraient la réplication du virus (Crook N.E. *et al.,* 1993 ; Yang Y.L. *et al.,* 2000). Des études génétiques et d'alignement de séquences ont ensuite permis l'identification d'un groupe de IAPs cellulaires chez la levure, *C.elegans, Drosophilia* ainsi que chez les vertébrés et dans de nombreux virus. Huit IAPs distincts sont identifiés chez l'homme : NAIP, c-IAP-1 et -2, Survivin, Bruce, ML-IAP, IPL2 ainsi que XIAP, les structures en domaines de ces IAPs sont présentées en **Figure 18 A** (Stennicke H.R. *et al.,* 2002). Sur les huit IAPs seulement trois sont capables de se lier directement aux Caspases, cIAP1, cIAP2 et XIAP. En revanche, seulement XIAP peut inhiber l'activité Caspase tandis que les autres peuvent inhiber la mort cellulaire mais pas directement l'activité des Caspases (Troy C.M. *et al.,* 2015). Ces inhibiteurs sont carcactérisés par la

présence d'au moins un domaine de liaison au Zn²⁺appelé BIR - *baculovirus IAP repeat* - et certains membres peuvent également posséder un domaine RING qui leur confèrent une activité d'E3 ubiquitine Ligase (**Figure 18A**). Composé de trois domaines BIR et d'un domaine RING en C-ter, XIAP est l'inhibiteur le plus puissant des IAPs et il inhibe efficacement les CASP-3, -7 et -9 (Deveraux Q.L. *et al.*, 1999).. Tandis que XIAP inhibe la CASP-3 par une interaction directe de son domaine BIR2 avec le site actif de l'enzyme, XIAP inhibe la CASP-9 en formant un hétérodimère avec le monomère de CASP-9 (Shiozaki E.N. *et al.*, 2003). Plus précisément, Le domaine BIR3 de XIAP se lie à la pc-9 en interagissant avec le brin β 6, hélice 5 et la longue boucle 6. Ainsi, XIAP inhibe la CASP-9 en empêchant l'insertion de la boucle L3 vers le brin β 6 qui permet classiquement de former le site actif. XIAP stabilise ainsi l'état inactif par hétérodimérisation (Clark A.C. 2016) (**Figure 18B**).

Le mécanisme d'inhibition de CASP-3 et -7 par BIR2 résulte d'une restriction de l'accès au substrat conséquence d'une interaction entre la région N-ter flexible de XIAP et du site actif de la protéase. L'inhibition réversible *tight binding* est expliquée par le blocage du site actif par une structure hélicoïdale en forme de crochet. La région N-ter inter domaine de XIAP se divise en trois zones, la zone « hook », la région linéaire, et « sinker ». Les principales interactions ont lieu entre la région « hook » et la boucle L4 de CASP-3 qui forme le sous-site S4, cette interaction empêche donc la fixation du substrat. La zone « sinker » ainsi que le domaine BIR2 permettent la stabilisation du complexe (**Figure 18C**). Ainsi, la fonction primaire du domaine BIR est d'aligner et stabiliser l'interaction entre l'inhibiteur et la protéase. Ce mode d'inhibition de XIAP peut être contré par SMAC/DIABLO qui est libéré en même temps que le cytochrome *c* suite à la PMEM (Stennicke H.R. *et al.,* 2002).



Figure 18. Inhibition des Caspases-3, -7 et -9 par XIAP.

(A) Organisation en domaines des IAPs. Les IAPs sont caractérisés par la présence d'au moins un domaine BIR qui peut être associé à d'autre domaines au sein de la séquence. Le domaine UBC est un domaine ubiquitine E2 et le domaine RING est homologue à l'adpatateur ubiquitin E3. Le domaine NATCH est une unité de liaison à l'ATP. Les valeurs des nombres indiquent la taille de chaque membre de cette famille. Les structures de NAIP et Bruce ont été tronquées pour simplifier la représentation Stennicke H.R. *et al.*, 2002. (B) Sur la droite est représentée la cavité centrale de la CASP-9 en rouge avec la longue boucle 6 (Code PDB : 1JXQ) tandis sur la gauche est représenté l'hétérodimère de CASP-9 et XIAP résultant de la fixation du domaine BIR3 au niveau de la cavité centrale de la CASP-9 (Code PDB : INW9) Clark A.C. 2016. (C) Inhibition de la CASP-3 par interaction avec le domaine BIR2 au niveau du site actif de l'enzyme. Pour les détails du mécanisme se référer au paragraphe *ci-dessus*.

1.2.2. Régulation de l'activité par des inhibiteurs naturels

En plus de ces régulateurs endogènes il existe des inhibiteurs viraux « Cowpox virus CrmA » et « baculovirus p35 » qui sont produits précocement dans le processus d'infection afin d'inhiber la réponse Caspase-dépendante chez l'hôte. P35 est une protéine de baculovirus qui bloque la réponse apoptotique dans les cellules d'insectes suite à une infection virale. Bien qu'il n'existe pas d'homologue dans les virus infectant les cellules de mammifères, les équipes de recherche ont employé des stratégies d'expressions ectopiques afin d'étudier les points de contrôle de l'apoptose. Ainsi, contrairement à l'action sélective de XIAP, les inhibiteurs appartenant à la famille p35 inhibent presque toutes les Caspases (Jabbour A.M. *et al.,* 2002). Le mécanisme d'action de p35 permet une inactivation de l'enzyme basée sur le mécanisme. En effet, dans une première étape, p35 est reconnu comme un substrat par une enzyme cible telle que CASP-8 qui attaque au niveau d'un résidu Asp sur une boucle réactive semblable à
une boucle du site actif des Caspases. Cette attaque permet la formation d'un thioester et le clivage de p35 qui induit à son tour un réarrangement structural de p35 au niveau des résidus 88-102 de la boucle réactive. Ces changements de conformations permettent la libération du brin N-ter qui contient une résidus Cys-2 essentiel. En effet, dans la structure native, ce résidu est enfoui dans un sillon profond situé en surface de la protéine. Suite au clivage de p35 et à la libération du fragment N-ter, Cys-2 se place au niveau du site catalytique de CASP-8 et séquestre l'Histidine catalytique par établissement d'une liaison hydrogène, empêchant son accessibilité au solvant et abolissant ainsi l'activité catalytique de CASP-8 (**Figure 19**) (Riedl S.J. *et al.,* 2001).

La famille des Serpines englobe beaucoup de protéines dans le règne Eucaryote. Bien que le nom serpin fasse initialement référence à des inhibiteurs de protéases à Sérine, des effets inactivateurs sur des protéases à Cystéines ont également été rapportés. Un exemple de cette cross-réactivité est CrmA qui bloque l'activité de quelques Caspases bien qu'il soit physiologiquement actif contre les CASP-1 et -8 seulement. D'ailleurs, il se lie et inhibe très efficacement ces deux Caspases avec des constantes d'inhibition, illustrées par les valeurs de K_i, qui rendent compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme, de respectivement 10 pM et 300 pM. Par conséquent, CrmA peut prévenir du clivage et de la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par CASP-1 et de l'apoptose induite par les récepteurs de mort régit par la CASP-8 (Callus B.A. et al., 2007). En position P1, CrmA possède un Asp, ce qui en fait un très bon inhibiteur de Caspases. CrmA accommode CASP-1 et -8 mais une insertion de neuf résidus au niveau de la boucle L4 dans les caspases exécutrices, empêche sa fixation au CASP-3 et -7. CrmA est également incapable d'inhiber la mort par la voie mitochondriale in vivo, bien qu'il soit capable d'inhiber CASP-9 in vitro, ceci pouvant être expliqué par des états conformationnels différents de la protéase en condition physiologique. Le mécanisme d'action de CrmA est similaire à celui observé pour l'inhibition des protéases à Sérines et semble également proche de celui observé pour p35 avec une inactivation irréversible basée sur le mécanisme. La séquence pseudo substrat de CrmA, LVAD, se lie au site actif des Caspases, la suite du mécanisme n'est pas encore totalement claire, mais une liaison thioester pourrait être formée et pourrait conduire à une dissociation des grandes et des petites sous-unités (Ekert P.G. et al., 1999; Stennicke H.R. et al., 2002;).



Figure 19. Mécanisme d'action de l'inhibiteur naturel p35 sur la CASP-8.

(a) La boucle reactive du (RSL) de p35 (en rouge) s'étend en périphérie de toute la protéine, ce qui lui permet d'interagir avec le site actif de la CASP-8. Cette boucle est reconnu comme un substrat au niveau du site actif de CASP-8, le clivage résulte en un réarrangement structural qui permet le déplacement du brin N-terminal (représenté en rose). Les surface des larges et petites sous-unités de la CASP-8 sont respectivement colorées en gris et cyan. P35 se lie comme un inhibiteur classique au niveau du site actif avec une liaison hydrogène établie entre la Cys-2 de p35 et l'histidine catalytique de la CASP-8. D'après Stennicke H.R. *et al.,* 2002.

2. Régulation des Caspases inflammatoires

Bien que la production d'IL-1 β soit nécessaire pour la gestion des infections aux pathogènes pour de nombreux processus biologiques, une production excessive de cytokine peut être dangereuse, et doit pas conséquent être finement régulée. En effet, la synthèse de l'ARNm d'IL-1 β est déclenchée par l'activation de la voie NF- κ B suite à des signaux extracellulaires tels que : endotoxines, TNF ou ester de phorbol, par conséquent en l'absence de ces signaux le taux d'ARNm est nul dans la cellule. La régulation des caspases inflammatoires au niveau de l'inflammasome est également un important point de contrôle important de la production d'IL-1 β (Martinon F. *et al.,* 2004).

Basé sur leurs structures modulaires, deux types de régulateurs de l'inflammasomes peuvent être distingués. Le premier est basé sur la présence d'un domaine CARD similaire à celui de la CASP-1. Ce groupe d'inhibiteurs inclus des molécules leurres codés par les gènes localisés à proximité de *CASP-1* tels que : *iceberg*, *INCA*, *COP*. Au travers d'interactions CARD :CARD ces protéines régulent négativement le clivage de proIL-1 β en empêchant le recrutement et donc l'activation de la CASP-1 par les adaptateurs protéiques ASC et NLRC4. Avec un processus similaire, le deuxième groupe d'inhibiteur qui inclut, DASC, bloque

l'activation de la CASP-1 puisqu'il possède un domaine PYD semblable au PYD de ASC, ainsi l'absence de domaine CARD dans séquence permet la séquestration de l'adaptateur protéique, bloquant ainsi l'accès de la CASP-1 à l'inflammasome dépendant de ASC. En revanche, l'inhibiteur protéase-9 (PI-9) inhibe la CASP-1 en se fixant au niveau de son site actif. L'expression d'ICEBERG et l'inhibiteur PI9 est induite par des agents pro-inflammatoires tels que le LPS et le TNF et font donc parti d'une boucle de rétrocontrôle négative (Green D.R. et al., 2001 ; Lee S.H. *et al.*, 2001).

Contrairement aux autres Caspases inflammatoires, la CASP-12 est particulière puisqu'elle agit en régulateur de la réponse inflammatoire. Chez les humains, le polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP) résulte en la synthèse d'une protéine tronquée, qui possède seulement un domaine CARD, ou d'une molécule non tronquée (CASP-12-L), qui semble être catalytiquement inactive du fait de l'absence de résidu clés autour du site actif. La majorité des Eurasiens ainsi qu'une proportion importante d'Africains expriment la version tronquée de la CASP-12 qui résulte d'une mutation au niveau du cadre de lecture qui génère un codon stop prématuré. En revanche, 20 % d'individus Sub-Saharien présentent un polymorphisme au niveau d'un nucléotide qui converti ce codon stop en un codon codant pour une Arginine restaurant ainsi la séquence entière de CASP-12. Ces individus répondent faiblement à une infection par du LPS et sont par conséquent prédisposés aux sepsis par rapport aux individus qui expriment la forme tronquée (Saleh M. et al., 2004 ; Galluzzi L. et al., 2016). Des études génétiques suggèrent que la protéine tronquée serait la conséquence d'une sélection positive, puisque la perte de la partie C-terminale serait un avantage qui permettrait d'accroître la résistance aux sepsis dans les populations exprimant cet allèle (Saleh M. et al., 2006). D'un point de vue mécanistique, la CASP-12 semblerait agir comme un leurre qui va bloquer l'activation de la CASP-1, résultant en une augmentation de la vulnérabilité aux infections bactériologiques (Scott AM et al., 2007).

C. « When dying is not the end »

Des études récentes menées sur les Caspases dans un grands nombres de tissus, organes et types cellulaire, suggèrent de nombreux rôles non apoptotiques. Elles seraient donc impliquées dans une grande variété de processus tels que : la différenciation de nombreux types cellulaire, la prolifération et la régénération des tissus ; Dans le système hématopoïétique les Caspases sont aussi impliquées dans la différenciation, maturation et activation des érythrocytes, lymphocytes, macrophages, mégacaryocytes et plaquettes. (;; Pérez-Garijo A. 2017 ; Nhan T.Q. *et al.*, 2006 ; Shalini S. *et al.*, 2015)

1. Caspase et différenciation cellulaire

1.1. Cas des cellules anucléés

L'implication des Caspases dans la différenciation cellulaire a été initialement décrite dans les cellules où la dernière étape de différenciation est associée à une perte du noyau. Tel est le cas pour les érythrocytes, les kératinocytes ainsi que les cellules du cristallin qui perdent leurs noyaux ainsi que d'autres organelles tout en étant métaboliquement actives. Dans ces cellules, les Caspases semblent agir à des étapes précoces à l'énucléation. Dans ces cellules le taux de Caspases actives n'est pas suffisant pour induire l'apoptose mais semble plus lié à un clivage sélectif de protéines cibles impliquées directement dans ce processus d'énucléation (Launey S. et al., 2005). L'implication des Caspases dans ces différents processus de différenciation est résumée en Table 2. Les Caspases, notamment CASP-2, -3, et -9 sont transitoirement activées avant l'étape d'énucléation au cours de la différenciation des érythrocytes. Dans les érythrocytes les Caspases sont activées en amont du processus d'énucléation et agissent indépendamment de leurs rôles apoptotiques, en clivant des protéines impliquées dans l'intégrité nucléaire (Lamine B) et dans la condensation de la chromatine (acinus). Ces implications ont été mise en évidence par un traitement avec l'inhibiteur z-VAD-fmk qui entraîne l'arret de la maturation des progéniteurs erythroïdes in vitro, avant le processus de condensation de la chromatine et du noyau. Le clivage de ces protéines participe au changements structuraux nucléaires associé à la maturation des érythroblastes et permet de préparer en partie l'énucléation. Dans ce rôle, les CASP-2, -3 et -9 sont activées de manière transitoire, ce qui suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation qui limite l'amplification du signal Caspase (Zermati Y. et al., 2001 ; Kolbus A. et al., 2004 ; Zhao B et al., 2016).

La différenciation des cellules du cristallin en fibres implique l'intervention d'acteur de la machinerie apoptotique. Dans ce processus, l'énucléation serait CASP-3 dépendante puisque le traitement avec l'inhibiteur z-VAD-fmk bloque le processus d'énucléation dans des modèles *in vitro* de différenciation. De plus, in vivo, une CASP-3 *like* est activée à des stades terminaux de la différenciation du cristallin. Finalement dans ce processus, un relargage de cytochrome c et l'activation de la CASP-3 sont détecté sans être associé à de la mort cellulaire. Il pourrait alors être supposé qu'une voie canonique de l'apoptose puisse être activée et simultanément restreinte par des mécanismes faisant intervenir les IAPs (McArthur K. *et al.*, 2018). De plus, une activation de la CSAP-6 a également été mise en évidence dans le cristallin d'embryon de rats au cours de la période ou la structure est éliminée soit 2-3 jours avant l'énucléation. (Ishizaki Y. *et al.*, 1998 ; Zandy A.J. et al., 2005 ; Shalini S. *et al.*, 2015).

Dans le processus de différenciation des kératinocytes les CASP-3 et -14 sont impliquées. En effet, le profil d'expression de CASP-14 est unique parmi les Caspases, puisqu'elle est présente essentiellement au niveau de l'épiderme et dans les corpuscules de Hassal au niveau du thymus. Dans la peau, elle est exprimée seulement dans les couches de différenciation, notamment au niveau de la couche cornée ainsi qu'au niveau des follicules pileux. Bien que toutes les Caspases soient constitutivement exprimées dans l'épiderme, seule CASP-14 est active au cours de la cornification. Au cours du développement, l'expression de CASP-14 est détectable de stade embryonnaire E15.5 et son activation est détectée au stade E17.5 ce qui coïncide avec la formation de la *stratum corneum* et l'établissement de la barrière de l'épiderme. Par conséquent, cette enzyme semble être impliquée dans la formation de la barrière embryonnaire (Denecker G. *et al.,* 2008 ; Lippens S et al., 2000) Au niveau de l'épiderme elle a également une fonction dans elle a une fonction dans la formation de la barrière de l'épiderme pour la protection contre les UVB et la déshydratation.

La CASP-3 semble également participer à l'engagement des kératinocytes embryonnaires dans la phase terminale de différenciation. En effet, dans ce processus, l'activité CASP-3 est induite par la signalisation de Notch1, un récepteur transmembranaire, avec pour conséquence le clivage et l'activation de la PKCô, un régulateur positif de la différenciation des kératinocytes. Dans les cellules du cristallin la perte du noyau au cours du processus de différenciation requiert l'activation des Caspases et notamment de la CASP-3 ainsi que la libération de cytochrome *c*, sans mort cellulaire associée. Dans ce processus il a été proposé que la voie mitochondriale soit activée et simultanément restreinte par la compartimentalisation des

Caspases ou par une hausse de l'expression des IAPs, permettant ainsi de favoriser la différenciation (Okuyama R. *et al.*, 2004 ; Shalini S. *et al.*, 2015).

Progenitor cells	Caspase activation	Mechanism
Erythroid cells	Caspase-2, -3 and -9	Cleavage of lamin B and acinus
Keratinocytes	Caspase-3	Terminal differentiation of embryonic cells involving Casp3-Notch1 mechanism
Lens cells	Caspase-14	Caspase-14 induction and processing during differentiation of keratinocytes
	Caspase-3	Lens fiber formation
Muscle progenitor cell	Caspase-3 and -9	Muscle fiber formation
Bone marrow stromal stem cells	Caspase-3	Osteoblasts and bone formation involving TGF β signaling
Osteoblasts	Caspase-2, -3 and -8	Activation of caspases in differentiating cells
Odontoblasts	Caspase-7	Activation of caspase-7 in bone-forming cells
Monocytes (bone marrow)	Caspase-3, -8 and -9	Macrophage formation
Neurons	Caspase-3	Neuronal differentiation, migration and plasticity
Embryonic stem cells	Caspase-3	Caspase-3-mediated cleavage of Nanog
Haematopoietic stem cell	Caspase-3	Maintenance of stem-cell quiescence and response to external stimuli

Table 2. Types cellulaires impliquant les Caspases pour la différenciation. D'après Shalini s. et al., 2015.

1.2. Cas des cellules nucléées

Une activité Caspase semble également requise pour la différenciation de cellules nucléés. L'un des exemples les plus étudié est la différenciation des myoblastes squelettiques. En effet, les souris constitutivement déficientes en CASP-3 qui survivent à la période périnatale sont beaucoup plus petites que les animaux contrôles, avec une réduction de la masse du muscle squelettique. Dans une étude publiée en 2010, les auteurs ont pu démontrer que la CASP-3 clivait CAD pour induire la dégradation de l'ADN requise pour induire la différenciation cellulaire du muscle squelettique. (Launey S. *et al.,* 2005 ; Larsen B.D. et al., 2010).

L'activation des Caspases est aussi présente dans le processus de différenciation des mégacaryocytes en pro-plaquettes. Les plaquettes sont de petites cellules anucléées essentielles à la coagulation du sang et à la cicatrisation des plaies. Elles sont issues des mégacaryocytes, qui sont de larges cellules polyploïdes qui se développent initialement dans la moelle osseuse. Au cours de la maturation des mégacaryocytes leur volume cytoplasmique augmente considérablement. Elles émettent ensuite de grandes protrusions appelées proplaquettes dans les capillaires sinusoïdes et c'est à partir de ce processus que les plaquettes sont évacuées dans la circulation jusqu'à ce que tout le cytoplasme des mégacaryocytes soit converti. Une activation localisée et contrôlée par BCL-2 de CASP-3 médiée par le relargage de cytochrome *c* participe activement à la formation des pro-plaquettes. De plus, les Caspases jouent également un rôle dans l'activation des plaquettes (De Botton S. *et al.,* 2002 ; McArthur K. *et al.,* 2018).

Une activité Caspases semble également requise pour la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, leur activité est nécessaire pour la différenciation des monocytes humains sanguins périphériques induits par le facteur de stimulation M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*). Une fois encore, cette activation des Caspases se fait sans l'activation de l'apoptose. Cette implication semble toutefois être spécifique puisqu'elle ne concerne pas la différenciation des monocytes en cellules dendritiques induite par les facteurs GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et IL-4. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'activation des CASP-3, -9 impliquait le relargage de cytochrome *c* et que cette activation était retardée par l'ajout de l'inhibiteur p35 ou en surexprimant BCL-2. (Sordet O. et al., 2002)

2. Caspases : prolifération et régénération tissulaire

De nombreuses études convergent vers une implication des Caspases dans la prolifération cellulaire. A l'aide d'outils pharmacologiques, tels que des inhibiteurs, il a pu être montré une implication de la CASP-8 dans la régulation de la prolifération des lymphocytes. Plus précisément la stimulation de lymphocytes T humains entraîne l'activation de la CASP-8 mais pas nécessairement de la CASP-3 dans les 4h suivant la stimulation. De plus, les traitements avec 50 µM d'inhibiteur IETD-fmk et YVAD-fmk permettent d'inhiber la prolifération des cellules T et de bloquer l'activation de la CASP-8par une co-stimulation CD3/FasL en 6 heures. (Kennedy N.J. et al., 1999). En effet, malgré une intégrité des thymocytes, l'absence de CASP-8 entraîne une diminution du nombre de lymphocytes T périphériques ainsi qu'une dégradation de la réponse de ces cellules à répondre à des stimuli d'activation, *ex vivo*. Les animaux CASP-8^{-/-} ne répondent pas à une infection virale, indiquant alors qu'une délétion de la CASP-8 dans les lymphocytes T conduit à une immunodéficience. (Salmena L . et al., 2002). Avec l'âge ces même animaux développent des phénotype liés à une prolifération anormale des lymphocytes tels que : adénopathie, splénomégalie (augmentation du volume de la rate) ainsi que l'infiltration de lymphocytes T dans de nombreux organes (Salmena L . et al., 2005). Ce rôle de CASP-8 serait expliqué par une compartimentalisation de son activation qui conduirait à l'activation de la voie NF-κB.

Les CASP-8, -1 et -6 semblent également réguler la prolifération des lymphocytes B et participer au maintien de l'homéostasie des lymphocytes. En effet, la stimulation de lymphocytes B humains est associé à l'activation des CASP-8 et -6 et à une réduction de

l'activité CASP-3. Cette activation semble être nécessaire à la prolifération des cellules B puisque le traitement avec l'inhibiteur général de Caspases z-VAD-fmk bloque la prolifération induite par la stimulation des récepteurs CD40 et CD180 (Olson N.E. *et al.,* 2003).

Dans des travaux réalisés en 2003, Minna Woo et al., ont démontré que l'absence de CASP-3 au niveau des cellules B de la moelle osseuse présentaient une maturation accélérée. Dans les cellules B activée de la rate, ils ont montré qu'en périphérie p21, qui est un substrat de CASP-3, régule la prolifération des cellules B. D'ailleurs, il est important de noter que ce clivage est restreint aux cellules B activées. Dans ce contexte, CASP-3 permet donc le clivage p21, ce qui bloque l'interaction de ce régulateur du cycle cellulaire avec PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Cette dernière est une protéine dont le rôle est d'augmenter fortement la processivité des ADN polymérases. Cette absence d'interaction entre p21 et PCNA prévient alors de la prolifération cellulaire, en présence de CASP-3 dans les cellules B activées (Woo M. *et al.,* 2003).

Les caspases sont également impliquées dans le processus de régénération tissulaires. En effet, lors de dommages, les cellules au niveau du site de lésion induisent l'apoptose. Il est clair aujourd'hui que l'activation des Caspases et que la sécrétion de signaux par les cellules mortes joue un rôle essentiel dans la régénération des tissus. La preuve la plus évidente de ce phénomène est observée chez l'hydre. Cet organisme a la capacité de produire deux nouveaux individus lorsqu'il est coupé en deux. Le principe de régénération est simple : les cellules apoptotiques au niveau du site de lésion mènent à l'activation de CASP-3 qui à son tour induit la production de Wnt-3. Ce signal permet l'activation de la β -caténine et la prolifération des cellules au voisinage du tissu endommagé, enclenchant ainsi la régénération (Chera S. et al., 2009). Chez les mammifères, un lien est établi entre l'activation des Caspase et la réparation des tissus pour la cicatrisation de la peau et la régénération du foie. Ces deux processus dépendent de l'activation des CASP-3 et -7 qui vont cliver la phospholipase A2 (iPLA2) entraînant ainsi l'augmentation de la sécrétion d'acide arachidonique et de lysophosphocholine qui permettent à leur tour la sécrétion de prostaglandine-E2 (PG-E2) qui permet la prolifération des cellules souches, la régénération des tissus et la réparation (Li F. et al., 2010).

3. Caspases et propriétés des cellules souches embryonnaires et pluripotentes induites

L'implication des Caspases dans la régulation potentielle de la physiologie des cellules souches a été évoquée pour la première fois en 2002 à partir des souris KO CASP-8, puisque, ces animaux meurent à des stades très précoce du développement avec des défauts morphologiques majeurs du tube neural. De manière intéressante ce phénotype n'est pas la cause de défauts apoptotiques mais sont plutôt attribués à une différenciation aberrante des précurseurs neuronaux. Mais ce n'est qu'en 2008 que le lien fut réellement établi entre les Caspases et les cellules souches embryonnaires (ESCs en anglais) puisque ces cellules murines déficientes en CASP-3 et -9 étaient incapables de se différencier. De plus, le clivage du facteur de transcription Nanog dans les cellules souches est effectué par CASP-3 et constitue une étape clé pour faciliter la différenciation des ESC humaines (hESC). En plus de ces fonctions dans la différenciation des ESC, l'activation des Caspases est aussi requise pour la dédifférenciation des fibroblastes en cellules pluripotentes induites ou iPSCs. En effet, ce processus requiert la dégradation de la protéine Retinoblastoma (Rb) par les CASP-3 et -8. Compte tenu de ces observations, les Caspases pourraient agir en régulateurs bimodaux et en fonction du contexte cellulaire et des partenaires d'interactions, elles pourraient contrôler le programme de différenciation en telle ou telle voie. (Baena-Lopez L.A. et al., 2017)

D. Caspases et Système nerveux central

1. Organisation générale du système nerveux central

Le neurone est une cellule excitable et post-mitotique est hautement spécialisée dans la réception, l'intégration et la transformation d'informations. Les neurones sont regroupés selon une topologie fonctionnelle, ainsi le cortex cérébral se divise en 52 aires appelées aires de Brodmann. Ces aires peuvent être divisées en trois groupes : les aires motrices situées au niveau du lobe frontal, les aires sensitives situées au niveau des lobes pariétaux, temporaux et occipitaux, et les aires associatives. Ces dernières, composent la majorité du cerveau et sont impliquées dans des processus cognitifs plus complexes (mémoire langage). Chaque neurone est intégré dans des réseaux multiples, ordonnés et hiérarchisés.

Le neurone se divise en trois parties ; un corps cellulaire de 5 à 120 μ M de diamètre ; des dendrites, qui sont des prolongements courts et ramifiées issus du corps cellulaire, qui forment une arborisation pour une grande surface de contacts ; l'axone est le plus long

prolongement du neurone et se termine par de nombreuses ramifications semblables aux dendrites, appelés boutons terminaux. Dans les réseaux de neurones, les synapses sont les zones de contact spécialisées qui permettent la transmission d'un signal entre deux neurones, pré- et post-synaptique, ou entre un neurone et son site effecteur (jonctions neuromusculaires par exemple). On distingue ainsi les synapses électriques des synapses chimiques qui utilisent un messager chimique ou neurotransmetteur pour transmettre l'information. Dans les synapses chimiques, 20 à 30 nm séparent les deux éléments cellulaires, c'est la fente synaptique. Le neurotransmetteur, libéré par l'élément présynaptique se fixe au niveau de récepteurs sur l'élément post-synaptique.

Un autre élément important du neurone est le cytosquelette composé de microfilaments, microtubules ainsi que de filaments intermédiaires. Il détermine et maintient la structure du neurone et joue un rôle important dans les processus de neurogénèse et de synaptogénèse en assurant le transport de molécules entre le cytoplasme et les prolongements neuronaux (axones et dendrites). Au niveau de la synapse il participe aux processus de libération des neurotransmetteurs en permettant la fixation de récepteurs membranaires.

Autour des neurones, cellules gliales forment un tissu de soutien et assurent la nutrition et la protection du neurone. En effet, les astrocytes d'aspect étoilé, ramifiés avec un corps cellulaire volumineux constituent un véritable tissu de soutien pour le neurone et assurent un support métabolique en communiquant avec les capillaires sanguins composant la barrière hémato-encéphalique. Les oligodendrocytes sont dédiés à la synthèse de la myéline dans le SNC. La myéline forme une gaine autour des axones pour permettre une transmission rapide et efficace de l'influx nerveux. Enfin, les cellules microgliales, qui forment la microglie assurent les fonctions immunitaires du SNC. Les cellules évoquées précédemment sont représentées en **Figure 20**.



Figure 20. Les différentes cellules du système nerveux central (McGraw-Hill Companies[®], 2008).

2. Physiologie

2.1. Activation des Caspases au cours du développement neuronal

Au cours du développement, la mort cellulaire programmée médiée par les Caspases permet de modeler l'organisme. Ce processus est essentiel à la formation du système nerveux où deux types de populations sont éliminées : les précurseurs neuronaux ainsi que les neurones post-mitotiques. Dans ces mécanismes d'élimination, les rôles de CASP-3,-9 et d'Apaf-1 sont primordiaux. En effet, les souris constitutivement déficientes pour ces protéines présentent une augmentation de l'épaisseur de la surface du cortex et une réduction drastique de l'apoptose à des étapes précoces du développement (Pompeiano M. et al., 2000 ; Troy C.M. et al., 2011). Leur absence est également liée à l'amplification de populations spécifiques de progéniteurs neuronaux entraînant une exencéphalie ainsi qu'une prolifération neuronale excessive. De plus, une mort des souriceaux survient rapidement après la naissance. Il est important de noter que les phénotypes peuvent varier en faction du fond génétique des animaux. Ces observations suggèrent, qu'au cours du développement du cerveau antérieur, CASP-3, -9 et Apaf-1 sont impliquées dans le contrôle, par apoptose, du nombre de cellules neuronales progénitrices mitotiquement actives ainsi que du nombre de neurones immatures. Les souris KO pour les CASP-1, -2,-6, -7, -11 et -12, en revanche, ne présentent pas de phénotype neuronal majeur (Table 3) (Yuan J. et al., 2000 ; Hyman B.T. et al., 2012).

Caspase	Development	Neuronal apoptotic phenotype
Caspase-1	Normal	Resistant to ischaemic brain injury and a decrease in incidence and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis
Caspase-2	Normal	Hippocampal neurons from caspase-2-null mice are resistant to anyloid- β (1–42) toxicity
Caspase-3	Perinatally lethal (depend on genetic background)	Lack of apoptosis in neuroepithelial progenitor cells during development
Caspase-9	Embryonic lethal (a small percentage of caspase-9-knockout can survive to adult)	Lack of apoptosis in neuroepithelial progenitor cells during development
Caspase-11	Normal	Resistant to apoptosis induced by ischaemic brain injury
Caspase-12	Normal	Cortical neurons are resistant to amyloid- eta toxicity

Table 3. Phénotypes neuronaux des souris constitutivement déficientes en Caspases. Yuan J. et al., 2000

2.2. Caspases et neurogénèse

L'étude des précurseurs des organes sensoriels chez la Drosophile a permis de mieux comprendre de nombreux aspect de la biologie du développement et ont également fournis des informations précieuses sur les mécanismes de la différenciation des cellules souches neuronales qui impliquent les Caspases. Chez la drosophile, Dronc (homologue de CASP-2) est notamment impliquée dans le contrôle du nombre des précurseurs des organes sensoriels. Des études menées sur la neurogénèse indiquent que l'activité de la CASP-3 au niveau des précurseurs neuronaux facilitent la neurogénèse. En effet, l'activité de cette enzyme est élevée dans les populations non apoptotiques neuronales en différenciation. Dans une étude publiée en 2005 les auteurs ont suggéré que CASP-3 puisse être impliquée dans la différenciation des progéniteurs neuronaux en conduisant à l'activation de Kinases de remodelage cellulaire. Par la suite ces Kinases sont capables d'activer d'autres Kinases en aval de la voie de signalisation, comme p38. Ces protéines ciblent alors le noyau et entraînent la phosphorylation de facteurs de transcription spécifiques de la différenciation (Fernando. P. et al., 2005). Ainsi, chez la souris, l'activité de CASP-3 est importante pour moduler la différenciation des précurseurs neuronaux, via des mécanismes qui impliquent la régulation du cytosquelette. CASP-3 semble d'ailleurs être également requise pour la synchronisation de la différenciation des neurones dans le cortex cérébral et des astrocytes au niveau du cervelet. Dans ce dernier type cellulaire, l'absence d'une activité CASP-3 entraîne une augmentation du nombre de précurseurs de cellules gliales tout en empêchant leur différenciation. (Oomman et al., 2006 ; Baena-Lopez L.A. et al., 2017).

2.3. Fonctions non apoptotiques des Caspases dans le système nerveux

De nombreuses études tendent à montrer que les Caspases ont des fonctions importantes, indépendante de l'apoptose, dans le système nerveux.

2.3.1. *Pruning* axonal et dendritique

Au cours du développement, les neurones étendent leur axone afin d'innerver leurs cibles résultant souvent en des connexions non pertinentes. Cette phase de croissance est alors suivie d'une phase de régression où les axones, dendrites ou synapses mal adressés sont éliminés tandis que les « bonnes » connexions sont préservées. Cette élimination sélective des structures du neurones est appelé pruning et se produit généralement sans mort du neurone (Schuldiner O. et al., 2015). Le pruning est un processus essentiel pour l'établissement de réseaux fonctionnels de neurones. Chez les vertébrés cette étape a lieu dès la naissance. Les premières preuves de l'implication des Caspases dans ce processus ont été apportées chez la drosophile, où la présence de DARK (homologue d'Apaf-1) et DRONC (homologue de CASP-2) sont requis pour le pruning. Dans les neurones sensoriels C4da, le système ubiquitine protéasome (UPS)régule le pruning des dendritique en faisant intervenir la machinerie apoptotique. Plus précisément, UPS induit la dégradation de l'E3 ubiquitine Ligase DIAP1 (*Death-associated inhibitor of apoptosis 1*). Cette dernière se lie classiquement à Dronc pour induire sa dégradation. Par conséquent au cours du développement neural de la Drosophile, l'UPS entraîne la dégradation de DIAP1 et permet ainsi l'activation locale des Caspases pour permettre le clivage des dendrites. (Kuo C.T. et al., 2006 ; Williams D.W. et al., 2006). Dans ce contexte, contrairement à la mort cellulaire par apoptose, l'activité des Caspases est localisée, notamment au niveau des dendrites des neurones qui subissent cette étape de pruning.

Dans le système nerveux périphérique, les Caspases sont également impliquées dans le *pruning* des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC en anglais) au niveau du mésencéphale des mammifères. Au cours du développement, les neurones dépendant de neurotrophines, facteurs nécessaires à leur survie et à la différenciation, étendent leurs axones pour innerver des cellules cibles productrices de facteurs de croissance neuronaux (NGF en anglais) par exemple.

Les neurones ont la capacité d'activer des voies de signalisation distinctes pour conduire à la dégénérescence de la cellule entière ou seulement de l'axone. Dans une étude publiée en 2014, les auteurs ont démontré que la CASP-6 était activée localement au cours du processus de dégénérescence axonale sur des neurones sympathiques, dans un contexte de carence en NFG uniquement. Dans cette même étude ils ont aussi mis en lumière le rôle des CASP-3 et - 9 dans la dégénérescence axonale dans un processus indépendant de l'adaptateur protéique

Apaf-1. Enfin, leurs résultats ont également montré que le protéasome et les XIAPs étaient responsables de la compartimentalisation de l'effet de ces caspases au niveau de l'axone (Cusack C.L. et al. 2013). Par conséquent, bien que les Caspases soient ubiquitaires dans la cellule, l'activation est réduite au niveau du compartiment axonal.

Un mécanisme proposé pour l'activation des caspases dans le processus de *pruning* est présenté en **Figure 21**. Le facteur de transcription c-jun est phosphorylé et activé par la voie de signalisation des kinases JNK/DLK. Ce dernier permet ensuite la transcription de facteurs pro-apoptotiques pour favoriser l'activation des CASP-3 et -6 par la voie intrinsèque permettant d'induire une dégénérescence localisée de l'axone (Gosh A.S. et al., 2011 ; Troy C.M. *et al.*, 2011 ; Hyman B.T. *et al.*, 2012 ; Hollville E. *et al.*, 2017).



Figure 21. Illustration du rôle des Caspases 3, -6 et -9 dans le *pruning* axonal.

En absence de facteurs neurotrophique tels que les facteurs de croissance neuronaux (NGF), l'activation de la voie JNK par la kinase DLK entraîne la stimulation de la transcription de facteurs pro-apoptotiques tels que Puma. Son expression résulte en l'activation de BAK puis de la PMEM qui entraîne la libération de cytochrome *c* et l'activation des CASP-9 et -3 par un processus dépendant ou non d'Apaf-1. L'activation de ces Caspases permet une dégénérescence locale de l'axone. D'Hollville E. *et al.*, 2017.

2.3.2. Guidance axonale et synaptogénèse

La croissance de l'axone et son bon adressage sont des étapes essentielles au cours du développement pour établir des réseaux de neurones fonctionnels (Van Battum E.Y. et al.,

2015). Les protéines impliquées dans ce processus dit de « guidance » sont soit sécrétées soit liées à la membrane pour être reconnues par des récepteurs spécifiques à la surface des extensions dynamiques des neurites qui cherchent à se connecter à leur cible, également appelé cônes de croissance. L'implication des Caspases dans la croissance des neurites et la guidance axonale a été mise en évidence chez le Xénope, dans les neurones du ganglion rachidien (Campbell D.S. et al., 2003). Netrin-1 est une protéine de guidance axonale sécrétée qui se lie à ces récepteurs DCC et UNC5 afin de promouvoir l'attraction ou la répulsion du cône de croissance. In vitro, CASP-9 et CASP-3 sont capables d'interagir avec le récepteur DCC pour que CASP-3 participe à l'effet attracteur de Netrin-1. Chez les neurones hippocampiques murins, la CASP-3 est également exprimée au niveau des cônes de croissance in vitro. Aussi, Le glycoprotéine NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) exprimées à la surface des neurones est capable d'interagir avec CASP-8 et déclenche l'excroissance des neurites dans un processus dépendent des CASP-3 et -8 (Westphal D. et al., 2010). Enfin, le développement des bulbes olfactifs chez les rongeurs implique l'activation de la CASP-3 dépendante de CASP-9. De manière intéressante chez les souris CASP-9^{-/-} et Apaf-1^{-/-} le nombre de neurones olfactifs n'est pas impacté mais les animaux présentent des aberrations dans la projection et l'adressage des axones de ces neurones (Ohsawa S. et al., 2010).

Les protéines Silt constituent une autre famille de molécule impliquées dans la guidance axonale et sont capables d'activer les Caspases après stimulation des récepteurs Robo. En fonction du contexte, la voie de signalisation initiée par les Silt ont un effet attracteur ou répulsif sur la croissance des axones mais elles ont aussi un effet répressif ou permissif sur l'arborisation au cours du développement. *In vivo*, Silt1a et son récepteur Robo2 stimule une activation locale et dans un temps imparti, de CASP-3 au niveau des points de branchements uniquement. Son activité favorise la formation des prolongements ainsi que leurs rétractations. Ensuite, Silt1a/Robo2/CASP-3 et -9 collaborent et interviennent dans le maintien des branches néoformées (Campbell D.S. et al., 2013) (**Figure 22**). D'ailleurs les souris KO CASP-9, présentent une diminution considérable des taux d'expression de Bassoon, une protéine de la matrice du cytosquelette qui constitue un bon marqueur présynaptique, ce qui suggère un rôle de l'activation des Caspases dans la maturation synaptique. Dans tous ces exemples rendant compte de l'implication des Caspases dans la guidance axonale, les mécanismes par lesquels elles sont activées et leurs modes d'action demeurent encore inconnus (Hollville E. *et al.*, 2017).



Figure 22. Rôle des Caspases-3, -8 et -9 dans l'excroissance des neurites, la guidance axonale et le branchement.

Les Caspases sont activées en réponse de la stimulation de récepteurs impliqués dans l'excroissance des neurites (NCAM), la guidance axonale (DCC en réponse à la fixation de Netrin-1 avec l'effet attracteur modélisé par des « + ») et le branchement (Robo2 stimulé par la fixation de son ligand Slit1a). Hollville E. *et al.*, 2017

2.3.3. Physiologie de la synapse

La plasticité synaptique jour un rôle crucial aussi bien dans la maturation des circuits de neurones que dans le remodelage. La modification de la synapse en réponse à une stimulation neuronale peut résulter en une augmentation ou une diminution de la force de la synapse on parle alors respectivement de potentialisation à long terme (LTP) ou de dépression à long terme (LTD) (Artola A. et al., 1990). La LTD se caractérise par une synapse qui devient moins sensible à un stimulus spécifique et résulte en une diminution de la taille ou en l'élimination de l'épine dendritique. En revanche la LTP résulte en un renforcement de la synapse. Ces processus régissent la plasticité synaptique. Par ailleurs, les LTP et LTD ont été largement étudiées dans le but de comprendre les bases moléculaires et cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire. Les LTP et LTD sont majoritairement déclenchées par l'activation synaptique des récepteurs au NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), suite à la fixation du neurotransmetteur L-glutamate, et se manifestent par des modifications de la transmission

synaptique médiée par les AMPARs (α -amino-3-hydroxy-5- methylisoxazole-4-propionic acid receptor). En se liant à aux NMDARs, le L-glutamate stimule la synapse en déclenchant une entrée de calcium qui résulte en une augmentation de l'expression des AMPARs au niveau des synapses présentant une LTP (Esteban J.A. et al., 2003), tandis que les AMPARs sont internalisés dans les synapses sous LTD (Beatitie E.C. et al., 2000). Les synapses sont ainsi capables de subir deux types de modifications de telle sorte que différents modes d'activations de la synapse résultent en une signalisation des NMDARs qui peuvent induire soit une LTP soit une LTD. Cette propriété semble être indispensable pour permettre au cerveau de stocker une grande quantité d'informations. La modulation de la force de la synapse au cours des LTP et PTD est associée à un remodelage de la taille et de la densité de l'épine dendritique, qui sont augmentée avec la LTP et réduite au cours d'une LTD (Zhou Q. et al., 2004).

In vivo, l'utilisation d'inhibiteurs de Caspases a permis de mettre en évidence l'implication de ces enzymes dans de nombreux processus tels que : la formation de la mémoire spatiale et auditive. D'ailleurs, en association avec leur rôle dans la formation de la mémoire, les Caspases actives sont détectées au niveau de l'Hippocampe, et du cortex chez la souris. Dans ces processus, l'activité des Caspases est restreinte aux structures postsynaptiques. La LTD induite par les NMDAR est réprimée dans les neurones hippocampiques de souris KO CASP-3, suggérant qu'elle soit suffisante pour réduire la force de la synapse dans ce processus. Afin de favoriser la LTP des NMDARs, la CASP-3 favorise sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale en faisant intervenir BAX . L'entrée de calcium via l'activation des NMDARs, essentielle à la LTP ou LTD, est également déclenchée par une voie de signalisation qui conduit à l'activation de CASP-3 afin de favoriser la LTD (Li Z. et al., 2010) ou l'inhibition de la LTP. Un modèle propose que l'entrée de calcium dans la synapse, entraîne la déphosphorylation de BAD par la calcineurine ou protéine phosphatase 2B (PP2B), qui permet alors l'activation de BAX. BAX à son tour permet la PMEM qui entraîne l'activation de CASP-3 (Jiao S. et al., 2011). La nature transitoire de ces processus est requise pour maintenir une activation faible de CASP-3 afin de prévenir de la mort du neurone. Il est donc possible que le neurone déploie une boucle de rétrocontrôle négatif pour limiter l'activation de CASP-3. D'ailleurs, en rapport avec une activation transitoire de CASP-3 en réponse à l'activité synaptique, l'activation de BAX, BAK et le relargage de cytochrome c se fait sur des temps très courts (Figure 23). Les LTP et LTD résultent toutes deux en un contrôle de l'expression des

AMPARs à la surface des synapses. Dans cet esprit, des preuves suggèrent un rôle de CASP-3 dans la régulation de la distribution de ces récepteurs. D'ailleurs, dans les neurones de l'hippocampe, une déficience en BAX, BAK ou CASP-3 résulte en un défaut de l'internalisation des AMPARs médiée par les NMDARs. La CASP-3 pourrait conduire à l'internalisation des AMPARs en clivant la protéine Gap43 au niveau de la synapse pour permettre la LTD et par conséquent l'internalisation des AMPARs dans les neurones de l'hippocampe (Han MH. et al., 2013). Elle pourrait également agir en activant un autre substrat, la calcineurine, qui est requise pour l'endocytose des AMPARs au cours de la LTD induite par les NMDARs. Enfin, il a pu être démontré que CASP-3 pourrait agir en clivant directement au niveau des sous-unités des AMPARs, pour l'inactiver, dans les neurones hippocampiques en réponse au peptide Aβ ou à la staurosporine.

En 2007, Peineau S. *et al.*, ont démontré que l'activité de la sérine/thréonine kinase, GSK3β, était essentielle pour la LTD dépendante des NMDARs dans l'hippocampe. D'ailleurs, cette forme de LTD est très rependue dans le cerveau et est fortement impliquée dans le développement de l'apprentissage et de la mémoire. En termes de mécanisme, l'activité de GSK3β détermine si les récepteurs au NMDA induisent ou inhibent la LTD. Ainsi, au cours de la LTD, l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1) permet la déphosphorylation et donc l'activation de GSK3β qui permet à son tour à la LTD de se produire. En revanche, au cours de la LTP, l'activation des récepteurs au NMDA conduit à une stimulation de la voie PI3K-Akt1, où l'activation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) mène à la production de phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ou PIP3. L'augmentation des taux de PIP3 entraîne le recrutement à la membrane de la kinase dépendante du 3-phospho-inositide (PDK1) et de la kinase Akt1. Cette dernière peut ensuite phosphoryler et inactiver la GSK3 β pour prévenir de l'induction de la LTD. Par conséquent, le clivage d'Akt1 pour son inactivation est requis pour la LTD dépendante de la signalisation des NMDARs. Il s'avère qu'Akt1 est un substrat de la CASP-3, ainsi CASP-3 pourrait favoriser la LTD et réprimer la LTP en inhibant Akt1 afin de promouvoir l'activation GSK3 β (Figure 23).



Figure 23. Rôle de la CASP-3 dans la dépression à long terme (LTD).

La CASP-3 participe à la plasticité synaptique des synapses glutamatergique en permettant la *down*régulation de l'expression des AMPARs à la surface de la synapse. La fixation du neurotransmetteur Lglutamate aux récepteurs au NMDA entraîne l'entrée de calcium au niveau de la synapse, cette entrée de calcium entraîne la déphosphorylation de BAD par la calcineurine, qui permet alors l'activation de BAX. BAX à son tour permet la PMEM et active la CASP-3. Cette derniere participe à la LTD médiée par les NMDARs, soit en permettant l'internalisation des récepteurs de manière indirecte en clivant ses substrats GAP43 et Akt1 ou en clivant directement les sous-unités des AMPARs pour les inactiver.

2.3.4. Restriction spatiale et temporelle de l'activité Caspase

Tous les processus évoqués précédemment nécessitent une activité restreinte en temps et en localisation, que ce soit au niveau de la dendrite au cours des étapes de *pruning*, ou au niveau des cône de croissance au cours du processus d'arborisation ou au niveau du bouton post synaptique au cours de la LTD. De nombreux mécanismes sont décrits pour limiter l'activité Caspases dans le neurone. Dans les neurones, les IAPs jouent un rôle majeur dans la restriction de l'activité Caspase afin de prévenir de la mort neuronale (Cusack C.L. et al., 2013). Toutefois, l'efficacité de XIAPs ne s'explique pas par une forte expression dans les neurones mais plutôt par de faible taux d'Apaf-1, qui limitent l'activation des Caspases en permettant un contrôle fin par les XIAPs (**Figure 24**). Par exemple, *in vitro*, XIAP restreint l'activation de CASP-3 et la dégénérescence axonale dans des modèles de carence en NGF du *pruning* axonal. XIAP prévient de l'internalisation des AMPARs et de l'activation de la CASP-3 au cours de la LTD. Cependant, lorsque l'activité Caspase est requise la levée de l'inhibition se fait par une dégradation ou par inhibition des XIAPs. En effet, XIAP peut être phosphorylé par la IKB kinase ϵ (IKK ϵ) pour favoriser sa

dégradation au niveau du protéasome afin de favoriser l'activation de CASP-3 (Kuranaga E. et al., 2006 ; Hollville E. *et al.*, 2017).



Figure 24. Régulation des activité Caspases dans les neurones.

Les XIAPs restreignent l'activité dans le temps et l'espace des Caspases-3 et -9 dans le neurone afin de prévenir de la mort cellulaire. Pour lever l'inhibition des Caspases, les XIAPs peuvent être phosphorylés par IKKɛ afin de favoriser leur dégradation au niveau du protéasome. Les XIAPs peuvent également être S-nitrosylés afin de favoriser l'activation des Caspases.

3. Fonctions des Caspases dans les maladies neurodégénératives

Les examens des tissus post-mortem tendent à impliquer les Caspases dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Troy C.M. et al., 2015). En effet, des Caspases clivées ont été identifiées dans : la maladie d'Alzheimer (AD ; CASP-3, -6 et -9), la sclérose latérale amyotrophique (ALS ; CASP-1 et -3), la maladie de Parkinson (PD ; CASP-3,-8 et -9), dans les ischémies (CASP-1 et -3) ainsi que dans la maladie de Huntington (HD ; CASP-1 et -8). Ces observations ne peuvent pas permettre de statuer quant à l'implication réelle des Caspases dans ces pathologies puisqu'il est impossible d'identifier de manière claire, les causes de la maladie à des stades si tardifs. Les limites des études sur les tissus *post-mortem* incluent : l'ampleur du processus pathologique au moment du décès, puisque chaque échantillon correspond à un seul stade du processus ; L'intervalle post-mortem ; la disponibilité des tissus de contrôles approprié et enfin le manque d'outils pour détecter les taux de Caspases. Compte tenu de tous ces éléments, la meilleure approche pour définir l'implication réelle des Caspases dans la maladie neurodégénérative reste les modèles animaux ou cellulaires (Troy C.M. *et al.*, 2002). L'accumulation de données révèle que les

Caspases ont un rôle crucial dans la progression d'une variété de désordres neurologiques. Malgré les origines multiples de ces maladies, les mécanismes de mort cellulaire relatifs à ces pathologies sont relativement conservés.

3.1. Rôles dans les pathologies aigues – Ischémie

accidents vasculaires cérébraux ou AVCs font partie des pathologies Les neurodégénératives aigues et sont la 3^{ème} cause de mortalité aux États-Unis et la 1^{ère} cause de la mortalité chez les femmes en France. Les AVCs ischémiques constituent 85% des formes d'AVC et résultent en un thrombus qui obture une artère cérébrale principale (ex : artère cérébrale moyenne) et entraîne une perte du flux sanguin locale. À moins que le flux sanguin soit rétabli rapidement, 3h après le début de l'occlusion la mort cellulaire est massive dans la zone de l'ischémie (Troy M.C. et al., 2011). Pathologiquement, une lésion induite par un AVC est caractérisée par un centre de mort nécrotique formé très rapidement à la suite de la lésion. Ce centre contient des neurones irréversiblement perdus et une zone dite pénombre. Cette région conserve une intégrité structurale avec toutefois des altérations fonctionnelles. Pour le traitement des AVCs, la pénombre est ciblée puisqu'elle peut être réparée. L'AVC ischémique est la première pathologie neurodégénérative pour laquelle une intervention des Caspases a été mise en évidence à faire intervenir les Caspases et notamment la CASP-1. En effet, l'expression d'un mutant de CASP-1 (ICE^{C285G}) dans des souris transgéniques présente un effet neuroprotecteur en réponse à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Friedlander R.M. et al., 1997). La CASP-6 est également impliquée dans les AVC, en induisant la dégénérescence axonale. En effet, dans des modèles d'ischémie chez le rat et la souris, la CASP-6 est temporairement activée au niveau des axones et des corps cellulaires suite à une lésion. Il a ainsi pu être montré que CASP-6 et -9 sont des régulateurs de la neurodégénérescence dans les ischémies cérébrales. Plus précisément, la CASP-9 agit en médiateur proximal de la mort neuronale induite suite à un AVC. L'activation de CASP-9 active ensuite la CASP-6 qui à son tour entraîne la dégénérescence axonale et la mort du neurone. L'administration d'inhibiteur de CASP-9 en intranasal, inhibe l'activation de CASP-6 et réduit la dégénérescence axonale dans les modèles d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, avec une neuroprotection allant jusqu'à trois semaines après la lésion (Akpan N. et al., en 2011). Pur l'inactivation de la CASP-9 le domaine BIR-3 de XIAP est lié de manière covalente à la Penetratin-1. Cette dernière permet de faciliter la traversée des membranes. La création d'un

lien covalent entre les deux entités permet ainsi au peptide de conserver sa conformation native une fois que la molécule a pénétré la cellule. Dans un cerveau de souris ischémique, une injection dans le fluide cérébrospinal (ICV) de l'inhibiteur de Caspases large spectre, z-VAD-fmk, réduit l'activation des Caspases, les dommages des tissus et les taux d'IL-1 β tout en améliorant les déficits comportementaux. (Yuan J. et al., 2000 ; Friedlander R.M. 2003 ; Hyman B.T. *et al.*, 2012).

3.2. Rôles dans les pathologies chroniques.

3.2.1. Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique ou SLA est caractérisée par une perte progressive et spécifique des motoneurones, qui transmettent l'information du cerveau aux muscles, dans le cerveau, le tronc cérébral ainsi que dans la moelle épinière conduisant à une paralysie et à une mort prématurée. Des formes familiales et sporadiques de la pathologie sont décrites. Les formes familiales des pathologies sont observées dans 10 % des cas. Deux gènes, *SOD1* et *ALS2* sont la cible de mutations et sont en cause dans ces formes familiales. D'ailleurs plus de 100 mutations touchent le gène codant pour la superoxyde dismutase ou SOD1, une enzyme antioxydante qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ces mutations causent une neurodégénérescence à travers de nombreux facteurs tels que : le mauvais repliement de protéine, l'altération de la réponse au stress oxydant ou déstabilisation du cytosquelette Des souris transgéniques qui expriment le gène mutant SOD1 humain développent des symptômes similaires à l'ALS, mort spécifique des motoneurones, faiblesse progressive et mort précoce (Kiernan M.C. et al., 2011).

Les premières preuves de l'implication des Caspases dans l'ALS proviennent de croisements d'animaux ALS avec des souris CASP-1^{-/-} ou les animaux résultant du croisement présentent une durée de vie augmentée de 9 % et une progression de la maladie ralentie à 50 %. De plus, l'injection en ICV de z-VAD-fmk, qui cible CASP-1 et CASP-3 notamment, montre un effet neuroprotecteur et étend la durée de vie des animaux de 22 % (Li M. *et al.*, 2000). Un rôle apoptotique pour les formes familiales d'ALS est suggéré par l'activité apoptotique dans des lignée cellulaires neuronales mutées pour *SOD1*. D'ailleurs, l'activation de CASP-1 et -3 a pu être mise en évidence dans des échantillons de moelle épinière de patients ALS ainsi que chez les souris mutantes SOD1. Un mécanisme proposé pour l'effet des CASP-1 et -3 est le

suivant : la CASP-1 pourrait initier la mort cellulaire par deux voies ; soit en augmentant la production d'Il-1 β soit en activant directement la CASP-3 (Yuan J. *et al.*, 2000).

3.2.2. Maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une forme autosomale dominante causée la dégénérescence de neurones dans le néostriatum et le cortex. Ces dommages entraînent des mouvements involontaires (chorée de Huntington), des symptômes psychiatriques, des altérations cognitives associés à de la démence. La pathologie a pour cause une mutation du gène (chromosome 4q16) codant la Huntingtine (htt), une protéine de 350 kDa, où l'insertion d'une séquence poly-CAG au niveau de l'exon 1 entraîne l'insertion d'une séquence polyglutamine (35 à 120 répétitions) en N-ter de la protéine Huntingtine (Bertram L. et al., 2005 ; Ross C.A. et al., 2011). La caractéristique de HD chez les humains et les modèles animaux est l'accumulation de fragments N-ter d'htt suggérant donc qu'une protéolyse excessive associée ou non à une mauvaise élimination de ces fragments soient la cause de HD. Par ailleurs, l'expansion de polygultamine résulte en la perte des neurones GABAergiques au niveau du striatum et la perte de neurones glutamatergiques au niveau des neurones corticaux qui projettent sur le striatum. Or, il s'avère que les fragments de htt sont abondants au niveau des projections des neurones corticaux, suggérant donc qu'une accumulation de htt dans ces neurones peut conduire à un dysfonctionnement des réseaux cortex-striatum et pourrait constituer un événement précoce de la pathologie. Toutefois, il est important de noter que la présence de ces fragments ne se traduit pas forcément en pathologie. Enfin, la translocation nucléaire de l'htt est associée à une forte toxicité in vitro et in vivo, plus précisément, un fragment en particulier pourrait être responsable de la neurodégénérescence dans HD. Dans des modèles animaux de la pathologie, YAC 128, la translocation nucléaire des fragments de mhtt coïncide avec l'apparition de la dysfonction motrice chez ces animaux, soutenant le rôle d'un fragment htt nucléaire spécifique dans l'initiation du dysfonctionnement neuronal.

In vitro, les CASP-3 et -6 clivent htt et la mutation de cinq sites potentiels de clivage de ces protéases bloque la cytotoxicité de l'htt de souris (mhtt) *in vitro*. Chez les modèles YAC 128, il a pu être montré que le clivage de mhtt au niveau de l'acide aminé 586 par CASP-6 est requise pour le développement des marques pathologiques et comportementales inhérentes à HD. En effet, une élimination sélective de ce site de clivage est suffisante pour protéger des dysfonctions neuronales et de la dégénérescence *in vivo*. Ces observations sont donc en

accord avec les faits énoncés précédemment où un seul fragment, celui généré par le clivage de mhtt au niveau du site IVLD⁵⁸⁶G par CASP-6, constitue l'élément déclencheur à l'origine de la cytotoxique qui induit dysfonction neuronale et la neurodégénérescence dans HD (Graham R.K. *et al.,* 2006 ; Warby S.C. et al., 2008 ; Bulat N. *et al.,* 2009).

3.2.3. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue chez les adultes. Elle se caractérise par une perte sévère des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire et par la présence d'inclusions cytoplasmiques constituées d'agrégats d' α -synucléine (corps de Lewy). Ces atteintes se manifeste par des troubles progressifs du mouvement comprenant la triade classique : tremblements, bradykinésie et rigidité (Bertram L. et al., 2005). L'analyse post-mortem des cerveaux de patients révèle que les neurones dopaminergiques présentent les caractéristiques d'une mort par apoptose (fragmentation de l'ADN, condensation de la chromatine, ...). De plus, l'expression de CASP-3 a été rapportée dans la substance noire après autopsie. Des modèles in vivo et in vitro de PD suggèrent également un rôle de l'apoptose dans la pathologie humaine. L'administration de 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6tetrahydropyridine (MPTP) chez la souris entraîne une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques dans la substance noire. Cette administration est également associée à l'activation de CASP-3 ainsi que de la fragmentation de l'ADN. De plus, l'expression de BAX est aussi augmentée après l'administration de MPTP, d'ailleurs les souris délétées pour l'expression de BAX sont résistantes à cet agent. Dans les lignées PC12, le 1-Methyl-4phenylpyridinium ion ou MPP⁺, un métabolite du MPTP, cause la mort des neurones dopaminergique en activant la CASP-3. Enfin, l'injection de MPTP dans des souris sauvages, conduit à l'activation de la CASP-3 mais aussi de CASP-8 et -9 ainsi qu'au clivage de BID et au relargage de cytochrome c dans la substance noire. Ces éléments suggèrent donc que la CASP-3 pourrait être l'effecteur final de la mort par apoptose dans les processus neurodégénératifs caractéristiques de la MP. Une voie possible de l'activation des Caspases suite au traitement des souris avec du MPTP pourrait être la suivante : l'administration du MPTP résulte en le relargage de cytochrome c et permet la formation de l'Apoptosome qui entraîne l'activation de CASP-9 et par conséquent l'activation de CASP-3. Cette dernière peut alors cliver ses substrats pour conduire à l'apoptose. La CASP-3 pourrait également activer la CASP-8, pour

qu'elle puisse à son tour cliver et activer BID pour faire une boucle d'amplification du signal apoptotique (Viswanath V. et al., 2001 ; Venderova KL. Et al., 2012).

3.2.4. Maladie d'Alzheimer

En 1906, Alois Alzheimer décrit une forme particulière de maladie, caractérisée par une détérioration cognitive progressive, des symptômes focaux, des hallucinations, illusion, et des problèmes de sociabilité chez Augustine Deter, la première patiente diagnostiquée pour la maladie d'Alzheimer (AD).

3.2.4.1. Physiopathologie

Pathologie neurodégénérative progressive associée à une perte de la mémoire, une désorientation spatiale ainsi qu'à une détérioration graduelle des capacités intellectuelles, la maladie d'Alzheimer est du point de vue cellulaire, caractérisée par un processus neurodégénératif chronique et progressif résultant de l'accumulation intra et extracellulaire d'agrégats de protéines : β -amyloïde (A β) et de Tau hyperphosphorylée. Malgré le manque de connaissance sur les voies de signalisation impliquées dans le processus pathologique, les deux marqueurs de la pathologie, eux sont bien connus, à savoir l'accumulation de neurofibrilles issus de l'agrégation de Tau, dans le neurone et les plaques amyloïdes formées d'A β à l'extérieur du neurone. L'accumulation de ces agrégats protéiques conduit à une dysfonction synaptique et à une mort neuronale. En condition physiologique, Tau est une protéine soluble, localisée principalement au niveau des axones, indispensable à l'activité neuronale puisqu'elle facilite la formation et la stabilisation des microtubules du cytosquelette, une fonction nécessaire pour le transport axonal. En condition pathologique, Tau est anormalement phosphorylée et ne peut donc plus se lier aux microtubules et se retrouve séquestrée au niveau des neurofibrilles pour former des agrégats à l'intérieur du neurone. Plus précisément, Tau forme des paires de filaments (10 nm de diamètre) hélicoïdaux qui s'agrègent ensuite pour former les enchevêtrements de neurofibrilles qui s'accumulent dans le soma et les dendrites (Figure 25 B). Ces modifications entrainent une instabilité des microtubules et donc une perturbation du transport axonal conduisant par la suite à la mort du neurone (Goedert M. et al., 2006 ; Spires-Jones T.L. et al., 2009). Dans la cascade amyloïde, les peptides Aβ sont produits suite au clivage de la protéine précurseur amyloïde, ou APP en anglais. Le gène localisé sur le chromosome 21, code pour une protéine transmembranaire qui possède un long domaine intracellulaire et une courte région

cytoplasmique, présente de manière prédominante au niveau du RE. Il existe trois isoformes de cette protéine, l'isoforme APP695 prédominant dans les neurones et les isoformes APP751 et 770 exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus, mais avec une abondance particulière dans le cerveau (Zeng H. et al., 2006). La voie dite « non amyloïdogénique » ou non pathologique, implique le clivage de l'APP par l' α -sécrétase dans le domaine A β prévenant ainsi de la formation potentielle des peptides cytotoxiques (De Strooper B. et De Strooper B. et al., 2010) (Figure 25 A). En revanche, dans la voie dit « amyloïdogénique » ou pathologique, l'APP subit deux étapes successives de clivage par les β - et γ - sécrétases. L'APP est tout d'abord clivé par la β -sécrétase qui condit à la libération de sAPP β en extracellulaire tandis que le fragment restant CTF β (ou C99) in intracellulaire, est clivé par la γ - sécrétase et entraîne la libération de peptides amyloïdes $A\beta_{1-40}$ et d' $A\beta_{1-42}$ monomériques qui s'oligomérisent ou forment des fibrilles qui s'agrègent en plaques amyloïdes cytotoxiques caractéristiques qui se déposent entre les neurones (Figure 25 A). Ces deux peptides sont retrouvés dans les plaques amyloïdes bien que le peptide A β_{1-42} , présente un fort potentiel à former des oligomères toxiques qui se retrouvent par la suite accumulés au niveau de ces plaques. L'A β_{1-42} peut facilement former des fibrilles et se dépose très précocement chez les patients AD ou atteints du syndrome de Down. Les espèces monomériques ne sont pas cytotoxique mais la formation de fibrilles et particulièrement la forme oligomérique, liée au mauvais repliement rendent l'Aß toxique (Viola K.L. et al., 2015). L'accumulation de ces plaques est associée l'hyperphosphorylation de Tau ainsi qu'à la perturbation des fonctions mitochondriales, la dérégulation de l'homéostasie du calcium, la perte synaptique et les perturbations cognitives (Puzzo D. et al., 2015).



Figure 25. Marqueurs de la Maladie d'Alzheimer.

(A) Représentation schématique des voies non amyloïdogénique et amyloïdogénique. Dans la voie non amyloïdogénique, non pathologique, le clivage de l'APP par l' α -sécrétase permet la libération d'un fragment sAPP α en extracellulaire, le fragments CTF α à la membrane est ensuite clivé par la γ - sécrétase pour former deux peptides P3 et AICD non toxiques. La voie pathologie ou amyloïdogénique est initiée par le clivage de l'APP par la β -sécrétase qui condit à la libération de sAPP β en extracellulaire. Le fragment restant CTF β est clivé par la γ - sécrétase et entraîne la libération de peptides amyloïdes A β monomériques qui s'oligomérisent pour former ensuite les plaques caractéristiques amyloïdes cytotoxiques qui se déposent entre les neurones. (B) Représentation schématique de la dérégulation de Tau dans la maladie d'Alzheimer. En condition physiologique Tau permet la stabilisation des microtubules dans les neurones. En condition pathologique, l'hyperphosphorylation de Tau compromet ses fonctions et empêche sa fixation aux microtubules. Tau hyperphosphorylée est ensuite séquestrée au niveau des neurofibrilles. La réduction du nombre de Tau conduit à l'instabilité des microtubules impactant ainsi le transport axonal (Bachurin S.O. et al., 2017). (C) Illustration d'une coupe transversale entre les cerveaux d'une personne saine et d'un patient atteint de la Maladie d'Alzheimer. Réduction considérable du cortex avec un rétrécissement particulièrement important au niveau de l'hippocampe. Il est également à noter un grossissement des ventricules, d'après www.alz.org.

3.2.4.2. Dépôts des plaques amyloïdes et des neurofibrilles

À des stades précoces de la pathologies les structures ciblées sont en premier lieu le cortex entorhinal et l'Hippocampe, on parle alors d'une atteinte de la voie perforante. De plus, au niveau fonctionnel, les stades très précoces de la pathologie sont caractérisés par une dysfonction synaptique (Angulo S.L. *et al.*, 2017).

Les premiers enchevêtrements de neurofibrilles (NFT en anglais) apparaissent au niveau du cortex entorhinal et de la zone CA1 de la corne d'Ammon de l'Hippocampe (Stade I et II). Ensuite les NFTs apparaissent et se développent au niveau du système limbique c'est à dire au niveau de subiculum (structure de l'hippocampe), de l'amygdale, du thalamus et du claustrum (stade III et VI). Enfin, les NFTs se propagent sur tout le néocortex, impactant les aires associatives (mémoire, langage, planification) puis les aires sensorielles et motrices (stade V-VI) (Braak H et al., 1991, 1994, 2006) (**Figure 26A**).

Thal et al., en 2002 ont proposé une progression des dépôt amyloïdes en cinq étapes. (1) Les plaques envahissent d'abord le néocortex, (2) puis évoluent vers le cortex entorhinal et l'hippocampe, l'amygdale et les cortex insulaire et cingulaires. (3) Ensuite, les dépôts se propagent au niveau du striatum, du thalamus, de l'hypothalamus et de la matière blanche. (4) Les plaques atteignent finalement une partie du tronc cérébral avant d'envahir le cervelet et le pont, partie centrale et renflée du tronc cérébral (5) (**Figure 26B**) (Serrano-Pozo A. *et al.,* 2011).



Figure 26. Stades de dépots des enchevetrement de neurofibrilles et de plaques amyloides.

(A) Représentation schématique de dépôts des NTFs au cours du temps. Les zones colorées indiquent la distribution des NFTs et les contrastes rendent compte de la densité de NFTs accumulées sur les régions. (B) Représentation schématique du dépôt des plaques amyloïdes au cours du temps d'après Thal et al., 2002, en coupe coronale (1), transversale (2) et sagitale (3). Ici les cind étapes sont résumées en trois stades : atteinte du néocortex (rouge) puis atteinte du système limbique (orange) et enfin à des stades plus tardifs atteinte du tron cébéral et du cervelet (jaune).

(Amyg : Amygdale ; EC : cortex entorhinal, CA1 : Corne d'Ammon (Hippocampe) ; Cg : cortex cingulaire ; 3-1-2 : aire sensorielle, 17 : aire visuelle ; 18 : aire associative)

3.2.4.3. Une pathologie multifactorielle

De nombreuses théories sont avancées pour expliquer les causes de cette pathologie, mais toutes mènent à la même conclusion, qu'AD est une pathologie multifactorielle et qu'un seul médicament ne peut pas être suffisant pour lutter contre la progression de la maladie. Outre les théories de Tau et l'hypothèse amyloïde d'autres théories sont avancées : les facteurs chimiques conduisant à un mauvais métabolisme du métal et à une altération des voies de signalisation, les dérèglements vasculaires, les facteurs aggravants comme le diabète, la tension et le cholestérol, les facteurs environnementaux et infectieux, ainsi que les prédispositions génétiques. Ces dernières incluent les mutations dans les gènes codants l'APP et les présénilines (PSEN) et les variations alléliques pour l'apolipoprotéine E (ApoE).

Une faible proportion des cas AD est due à des mutations génétique conduisant à une transmission autosomale dominante et concerne les gènes *APP* (chromosome 21) (Chartier-Harlin M.C. et al., 1991) ; *PSEN1* et 2, localisés sur les chromosomes 14 et 1 respectivement (Borchelt D.R. et al., 1996). Les patients présentant ces mutations au niveau de ces gènes montrent un développement prématuré de la maladie. Environ 85% des formes familiales correspondent à une mutation de *PSEN1* tandis que les mutations sur *APP* et *PSEN2* sont moins fréquentes. En tout, 157 mutations sont référencées sur *PSEN1*, contre 10 sur *PSEN2*. Les formes sporadiques représentent la majorité des cas et se manifestent tardivement, audelà de 65 ans et ne semble pas être sous l'influence de facteurs génétiques.

3.2.4.4. Impact sociétal et économique

Aux États-Unis entre 2010 et 2011, les conséquences économiques de la Alzheimer sont estimées à 215 milliards de dollars. Les ventes de médicaments pour le traitement de la maladie a atteint 8,3 milliards. Entre 2002 et 2012 c'est 413 essais cliniques sur 224 médicaments potentiels qui ont été conduits ; soit 124 études en phase I, 206 études en phase II et 83 en phase III. Depuis, 2007 lorsque la FDA (Food Drug and Administration) a obligé l'enregistrement des essais cliniques c'est seulement 54 études qui sont entrées en phase III (Bachurin S.O. *et al.*, 2017).

Actuellement en France, d'après les données de France Alzheimer, la maladie d'Alzheimer est la 4^{ème} cause de mortalité en France avec 900.000 personnes atteintes. C'est aussi, 1 nouveau cas qui est diagnostiqué toutes les 3 minutes, soit 616 nouveaux cas par jour donc près de 225.000 nouveaux cas diagnostiqué chaque année. 1 Patient sur 2 est diagnostiqué, dont 1 sur 3 qui l'est au stade précoce. Parmi les personnes atteintes, 32.000 ont moins de 65 ans, soit 3,1 % des cas référencés. Une maladie donc bien réelle avec des conséquences multiples puisque 9,9 milliards d'euros sont consacrés à la prise en charge médicale et médicosociale en France, avec un coût annuel par patient évalué à 22,099 € soit 12,146 assumés par la famille et 4.225€ apporté par le Conseil général. La maladie d'Alzheimer c'est aussi plus de 10 millions d'euros consacré à la recherche depuis 1988 et aucun traitement curatif pour guérir de la maladie ni aucun traitement préventif. Si rien ne change, 1 français sur 4 de plus de 65 ans sera concerné par la maladie en 2020.

3.2.4.5. Caspases dans les cerveaux AD

Dans les analyses *post-mortem* des cerveaux de patients AD, une augmentation de l'expression des ARNm de nombreuses Caspases (-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8 et -9) a été mise en évidence en comparaison avec des cerveaux sains. Au niveau protéique, il est à noter une augmentation de l'expression de CASP-2 (Jean Y.Y. *et al.*, 2013), CASP-9 et des CASP-3 et -6 clivées (Troy C.M. *et al.*, 2011 ; 2015).

3.2.4.6. Caspases et clivage de l'APP

L'APP possède 3 sites potentiels de clivage pour les CASP-3, -6, -7 et -8 (**Figure 27**). Par exemple, dans des cultures de neurones en absence de sérum, la CASP-6 est activée et peut cliver l'APP pour permettre la libération d'un fragment de 6,5 kDa qui contient le fragment A β . Par conséquent les Caspases semblent jouer un rôle important dans la neurotoxicité induite par le peptide A β . D'ailleurs, les plaques amyloïdes sont enrichies en A β résultant du clivage par les Caspases (Gervais F. *et al.*, 1999 ; LeBlanc A. *et al.*, 1999 ; Pellegrini et al., 1999). En plus du rôle cytotoxique d'A β , la libération du fragment C99 ou CTF β , en intracellulaire suite au clivage par la β -sécrétase s'avère être également toxique pour les neurones *in vitro*. De plus, l'expression de ce fragment dans les cerveaux de souris conduit aux dépôts d'A β et à une neurodégénérescence ainsi qu'à une altération du comportement et des défauts synaptiques. Les Caspases sont également capables de cliver C99 en C31 et ce dernier fragment semble être également cytotoxique pour la cellule.



Figure 27. Sites de clivages putatifs des Caspases sur la protéine précurseur amyloïde.

Représentation de la séquence de la protéine précurseur amyloïde. Localisation des sites de clivages des Caspases (-1, -3, -6, -7 et -8). Les trois sites de clivage sont indiqués en dessous de la séquence en gras avec le nombre se référant à l'Asp en P1. La région contenant le peptide A β est agrandie au dessu de la séquence. Les sites de clivage des α -, β - et γ - sécrétases sont également renseignés.D'après Gervais F.G. *et al.*, 1999.

3.2.4.7. Caspases et clivage de Tau

Les Caspases sont également capables de cliver Tau. D'ailleurs, la CASP-6 active colocalise avec les neurofibrilles dans le cortex et l'hippocampe chez l'humain. Les CASP-1, -3, -6, -7 et -8 sont capables de cliver Tau en C-ter au niveau du motif DMVD⁴²¹-S, *in vitro*. Avec toutefois un clivage plus efficace par les CASP-3, -7. De plus, ce clivage favorise la formation de filaments in vitro. Le clivage par les Caspases au niveau de l'Asp-421 entraîne la libération d'un fragment C-ter de 20 acides aminés qui préviendrait de l'assemblage des filaments in vitro. En effet, en absence de clivage, ce dernier peut se replier sur la région de liaison au microtubule empêchant ainsi la polymérisation à partir de cette région. Ce clivage a lieu dans des neurones corticaux traités avec de l'Aß ce qui suggère un lien entre les plaques amyloïdes extracellulaires et les enchevêtrements de neurofibrilles de Tau hyperphosphorylée. En effet, le peptide A β pourrait induire l'activation des Caspases, qui iraient ensuite cliver Tau pour favoriser l'assemblage des filaments ou inhiber le désassemblage dans le but de stabiliser les filaments. Des études récentes ont montré que des neurones déficients en Tau étaient résistants à la neurotoxicité induite par Aβ. Tous ces éléments suggèrent que Tau pourrait être un acteur crucial des processus neurodégénératifs initiés par A β (Gamblin T.C. *et al.,* 2003). Dans une étude publiée en 2015, Lloret A. et al., ont proposé que l'une des possibilités pour expliquer un lien entre Ab et l'hyperphosphorylation de Tau soit la suivante. Le peptide amyloïde entraîne une surproduction d'ERO (Anandatheerthavarada H.K. et al., 2003). Ce stress oxydant pourrait alors activer RCAN, un inhibiteur des phosphatases de Tau d'une part, et activer p38, un activateur de la phosphorylation de Tau, d'autre part. Ces deux évènements pourraient ainsi contribuer à l'hyperphosphorylation de Tau.

3.2.4.8. Caspases et inflammation dans Alzheimer

L'inflammation contribue à la progression de la maladie d'Alzheimer (Heneka M.T. et al., 2007). En effet, la formation de dépôts amyloïdes initie une série d'événements moléculaires capables de déclencher une réponse immunitaire au travers de l'activation de la microglie et des astrocytes. Et ce, à travers l'induction de molécules pro-inflammatoire qui conduisent à des altérations de la synapse, une perte neuronale et l'activation d'autres molécules pro-inflammatoires. Les cerveaux AD présentent une forte expression au niveau des ARNm mais aussi au niveau protéique des IL-1 β et IL-18, et les deux colocalisent avec le peptide amyloïde et Tau. Chez les modèles animaux AD, Tg2576, les astrocytes et la microglie

entourent les plaques amyloïdes et l'expression d'IL-1 β est nettement augmentée dans ces astrocytes suggérant donc que l'A β induit une activation de ces cellules. De plus, de fortes concentrations en IL-1 β sont détectées dans le fluide cérébrospinal des patients.

Les formes fibrillaires d'A β induisent la production d'IL-1 β en passant par l'inflammasome NLRP3. Cependant, l'activation directe par interaction ou indirecte par l'intervention d'autre voie de signalisation est encore peu définie. Un mécanisme proposé pour cette voie de signalisation et que l'Aβ soit phagocyté par la microglie. Au niveau de celle-ci, la dégradation de l'Aß au niveau des lysosomes s'avère inefficace et entraîne donc une perte de l'intégrité lysosomale qui conduit au relargage de leur contenu dans le cytoplasme, avec notamment la libération de Cathepsine B. Cette dernière semble être l'intermédiaire pour initier le relargage d'IL-1 β via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la CASP-1. Bien qu'il ne soit pas encore clairement défini si la Cathepsine B interagit directement NLRP3 ou si ce dernier interagit plutôt avec un intermédiaire activé par cette enzyme. Le relargage d'IL-1 β entraîne alors la libération de deux médiateurs de l'inflammation et de la neurotoxicité induite par A β à savoir le TNF et le monoxyde d'azote. Enfin, la sécrétion de chimiokines par la microglie en réponse à l'Aβ se fait de manière dépendante de l'activation de NLRP3 et de CASP-1. Cette sécrétion contribue à l'accumulation de microglie autour des plaques séniles. Par conséquent, NLRP3, au travers de l'activation de CASP-1, contribues aux effets pro-inflammatoires, chimiotactiques et neurotoxiques de A β par la microglie (Halle A. *et al.*, 2008 ; Heneka M.T. *et* al., 2013).

3.2.4.9. Caspases et cytotoxicité de Aβ

Le clivage de l'APP par les β - et γ -sécrétases permet la libération, en extracellulaire, de fragments A β_{1-40} et A β_{1-42} qui vont former des fibrilles ou des oligomères formant les plaques amyloïdes (**Figure 28**). L'accumulation de ces plaques autour du neurone facilitent l'activation des Caspases, pour initier la mort par apoptose, par diverses voies : stress du RE (cas de CASP-4), stimulation des récepteurs de mort (Fas/TNFR), ou via l'activation de la voie intrinsèque suite à une augmentation du taux d'ERO. En intracellulaire, l'activation des Caspases exécutrices et notamment de CASP-3 peut favoriser le clivage du fragment C99, formé suite au clivage par la β -sécrétase, pour libérer un fragment C31 cytotoxique qui constitue une boucle d'amplification du signal neurotoxique de l'A β . Les Caspases activées agissent aussi dans la formation des neurofibrilles dans le neurone et ce, en clivant directement Tau.

L'enchevêtrement de neurofibrilles dans le neurone aboutit dans un premier temps à une altération du transport axonal pour mener au final à une mort du neurone. Enfin, l'activation des Caspases permet aussi le clivage de substrats protéiques qui peuvent à leur tour entraîner une détérioration du transport axonal et dendritiques menant, là aussi, à la mort cellulaire.

En plus d'être les médiateurs de la toxicité induite par l'A β , les caspases jouent également un rôle dans la production de l'A β . Généralement la β -sécrétase est éliminée par la voie lysosomale, d'ailleurs un motif Leu-Leu localisé en C-ter de la protéase (DXXL) est reconnu par une protéine adaptatrice GGA3 (*Golgi-localized y-ear-containing ARF binding protein*) qui va permettre l'adressage de BACE au lysosome. Cependant, au cours de l'apoptose, CASP-3 est capable de cliver GGA3, favorisant ainsi la stabilisation de BACE en empêchant ainsi sa dégradation (Tesco G. *et al.,* 2007). CASP-3 est aussi capable de cliver et d'activer GSAP (*gamma-secretase-activatong protein*) pour qu'elle puisse faciliter la production d'A β en interagissant avec la γ -sécrétase. La preuve est apportée par le fait que le blocage pharmacologique de l'activation de de CASP-3 *in vivo* résulte en une diminution significative des taux de GSAP ainsi que de la formation du peptide amyloïde dans les souris 3xTg (Chu J. *et al.,* 2015).



Figure 28. Mécanisme d'action des Caspases proposé dans la maladie d'Alzheimer.

L'APP peut être clivé pour délivrer de nombreux produits, A β , c99 ou (CTF β) et C31. C99 et C31 sont en intracellulaire et sont toxique pour ce dernier. En extracellulaire les peptides amyloïdes peuvent former des fibrilles et des oligomères qui s'agrègent pour former les plaques amyloïdes ou plaque séniles qui se forment classiquement entre les neurones chez les patients AD. L'accumulation des plaques en extracellulaire entraîne des stress du RE, l'activation des Caspases et l'hyperphosphorylation de Tau. Tau est également clivé par les Caspases, favorisant ainsi la formations de l'enchevêtrement de neurofibrilles dans le neurone. Tous ces élements entraînent des dysfonctionnements du neurone qui mènent à la mort de la cellule. D'après Troy C.M. *et al.*, 2011

III.La Caspase-2 : « The Cinderella Caspase »

A. Généralités sur la Caspase-2

1. Historique

La CASP-2 (CASP-2) est la deuxième Caspase identifiée et c'est aussi le membre le plus conservé de cette famille d'enzyme, qui partage une forte homologie avec CED-3 de C. elegans et Dronc chez la Drosophile. Initialement nommée NEDD-2, son gène a été identifié par Kumar S. et al., en 1992, comme régulateur du développement du cerveau murin. En effet, les études réalisées sur les ADNc isolés ont révélé que l'ARNm de 3,7 kb était exprimé principalement au cours du développement embryonnaire du cerveau et *down*-régulé dans le cerveau adulte. D'ailleurs, puisque la mort neuronale est une étape précoce et cruciale du développement du cerveau, l'équipe de Wang L. et al., en 1994 a poursuivi les recherches afin de déterminer si *Nedd-2* était un gène de mort cellulaire. Ils ont ainsi identifié le gène *Nedd-2* humain qu'ils ont appelé *Ich-1* pour *interleukin-1* β *converting enzyme homologue 1*, comme gène codant pour une protéine plus longue que NEDD-2. Ils ont aussi mis en évidence que l'ARNm codant cette protéine subissait des étapes d'épissages alternatifs qui résultent en la synthèse de deux isoformes. Un ARNm code pour une protéine de 435 acides aminés, appelé isoforme long ou CASP-2_L qui consiste en un pro-domaine contenant un domaine CARD suivi d'un domaine catalytique contenant les grande et petite sous-unité p20, p10. Cette isoforme, catalytiquement actif, partage des homologies de séquences avec ICE et CED-3, respectivement 27 et 28 % d'identité. L'autre ARNm, lui, code pour une protéine tronquée de 312 acides aminés qui ne possède pas de petite sous-unité p10. Cet isoforme court (short) ou CASP-2_s, catalytiquement inactif, se termine 21 résidus après la séquence conservée QACXG qui abrite la cystéine catalytique. Ils ont également démontré que la surexpression de CASP-2_L induisait la mort cellulaire tandis qu'une surexpression de CASP-2_S prévenait de la mort cellulaire programmée des fibroblastes de rat (Rat-1) induite par une carence en sérum. Ils avaient alors conclu sur le fait qu'ICH-1 pouvait jouer un rôle important dans la régulation positive et négative de la mort cellulaire programmée chez les vertébrés.

2. Structure et régulation du gène CASP-2

Le gène humain codant pour CASP-2 localisé sur le chromosome 7q34-35 est formé de 12 exons (Kumar S. *et al.,* 1994). Son expression est sous le contrôle de différents promoteurs et de deux événements majeurs d'épissages qui ont pour conséquence l'inclusion ou

l'exclusion des exons 1 et 9. Tous les évènements jusqu'à la synthèse des isoformes 2_L et 2_S sont représentés en **Figure 29**.

Sur le gène *CASP-2*, la transcription à partir d'un promoteur localisé en amont de l'exon 1(L), non codant génère un pré-ARNm qui subit des étapes d'épissage. Au cours de ce processus, une séquence régulatrice sur l'intron 9 permet l'exclusion de l'exon 9 générant ainsi un ARNm codant l'isoforme long, CASP-2_L.

Sur le gène *CASP-2*, un second promoteur localisé en aval de l'exon 1(L) permet l'exclusion de l'exon 1 et la synthèse d'un pré-ARNm alternatif. L'épissage de ce transcrit conduit à la formation d'un ARNm codant un isoforme court, CASP-2_L. Dans la séquence de l'ARNm, la présence de 61 paires de bases (pb) correspondant à un exon dit « alternatif » ou exon 9, entraîne un décalage du cadre ouvert de lecture et a pour conséquence la formation d'un codon stop prématuré localisé en fin de séquence de cet exon (Logette E et al., 2003 ; Kitesvka T. *et al.*, 2009).

L'inclusion ou l'exclusion de l'exon 9 dépend d'une séquence régulatrice intronique de 100 nucléotides, appelé In100, localisée dans l'intron 9 et qui permet de réguler l'épissage au niveau de cet exon. L'élément In100 est divisé en deux domaines juxtaposés qui participent à l'élimination de l'exon 9 selon deux mécanismes distincts. La première portion de cette région consiste en un site 3' accepteur d'épissage leurre suivi d'un élément riche en pyrimidine, répresseur, In50dn. Côté et al., en 2001 ont proposé un modèle selon lequel le site leurre accepteur 3' engagerait un complexe d'épissage dit « non productif » ou « pseudospliceosome », en fixant le complexe ARN/protéine U2 small nuclear RiboNucleoProtein (snRNP). Ce dernier se lierait ensuite à U1-snRNP sur le site d'épissage 5' de l'exon alternatif pour favoriser l'appariement des exons 8 et 10. La région In50dn participerait à l'interaction non productive du site leurre dans le but d'éliminer cet exon. D'ailleurs, cette portion de In100 peut interagir avec un facteur de régulation majeur de l'épissage alternatif, polypyrimidine tract binding protein ou PTB pour participer à l'exclusion de l'exon 9. Ainsi chaque domaine de l'élément In100 peut fonctionner indépendamment pour réprimer l'inclusion de cet exon alternatif. La liaison de PTB à In50dn est la partie intégrante d'un mécanisme coordonné, qui inclut l'utilisation du site leurre 3' pour maintenir un faible niveau d'inclusion d'exon 9 dans la majorité des types cellulaire. (Côté J. et al., 2001a et 2001b)

Des études complémentaires de la séquence des ARNm ont également mis en évidence l'existence de trois sites potentiels d'initiation de la traduction au niveau de l'exon 2 pour

l'isoforme long, bien qu'une seule séquence corresponde à la séquence consensus d'initiation ACCAUGG identifiée par Kozak en 1986. En revanche pour l'isoforme court, deux sites d'initiation de la traduction sont fonctionnels et permettent la synthèse de deux isoformes de CASP-2_s (Logette E et al., 2003). En plus de ces isoformes, il semblerait que deux isoformes additionnels existent. En effet, l'expression de CASP-2_s-pro et CASP-2_L-pro seraient la conséquence d'un événement d'épissage entre une partie de l'exon 4 avec une région dans l'exon 6. Cette étape entraînerait un décalage du cadre ouvert de lecture et un arrêt de traduction prématurée après le domaine CARD.



Figure 29. Génèse des isoformes de Caspase-2S et 2L.

L'isoforme pro-apoptotique 2L est généré par initiation de la transcription à partir d'un promoteur en amont de l'exon 2. Le pré-ARNm CASP-2L contient un premier exon non codant qui commence au nucléotide 3146 en amont du second exon contrairement au premier exon du pré-ARNm qui débute à 1952 nucléotides en amont de l'exon 2. L'ARNm codant CASP-2S possède un exon 9 qui contient un codon stop résultant en une terminaison prématurée de la traduction. L'ARNm codant CASP-2L exclu l'exon 9 par un processus d'épissage alternatif sous le contrôle d'une séquence régulatrice In100. L'initiation de la traduction de CASP-2S put avoir lieu à partir du premier ou du second codon start (sur trois séquences existantes) tandis que la traduction début à partir du troisième codon start pour CASP-2L. Les exons sont numérotés au-dessus de la séquence du gène codant CASP-2 et des ARNm. Les lignes en pointillés indiquent les évènements d'épissage, les sites d'initation de la traduction sont représentés par des flèches sur la séquence des ARNm. Les codons stop sont modélisé par des panneaux de signalisation sur la séquence des ARNm. Kitesvka T. *et al.*, 2009

3. Localisation tissulaire et subcellulaire

Chez la souris, les ARNm codant CASP- 2_{L} sont retrouvés dans la majorité des tissus tandis qu'au niveau protéique, CASP- 2_{L} est abondamment exprimée : dans le cerveau, le
thymus, dans les ganglions lymphatiques, le colon, le petit intestin et les testicules. Elle est cependant plus faiblement exprimée dans les reins, les glandes salivaires et le cœur. En revanche, l'expression de CASP-2_s est variable et difficilement détectable et dépend du type cellulaire, du tissu ainsi que des étapes de développement embryonnaire considérés. Elle pourrait cependant être présente dans quelques tissus dont la rate, le thymus et le cerveau. Enfin, l'isoforme supplémentaire CASP-2_L-pro est exprimé dans la peau, le cerveau et dans le colon.

Dans la cellule, le zymogène de CASP-2 ou pc-2, réside dans le cytosol et de nombreux autres compartiments cellulaires incluant, l'appareil de Golgi, la mitochondrie et le noyau, dépendant du statut de différenciation de la cellule. Toutefois sa localisation mitochondriale reste soumise à controverse (van Loo G. et al., 2002). Le zymogène pourrait être activée dans ces différents compartiments tandis que la forme active pourrait subir une translocation en réponse à des signaux apoptotiques ou pourrait être activée dans le noyau sans relocalisation au cytoplasme. Une particularité de cette enzyme est la localisation constitutive du zymogène dans le noyau, où elle est concentrée en filaments ou en spots conséquence d'une oligomérisation de la protéine via les domaines CARDs. Cette localisation semble importante pour les fonctions de CASP-2 dans la réponse aux dommages à l'ADN et à l'instabilité génomique. Deux signaux de localisation nucléaires ou NLSs, localisés sur le pro-domaine de CASP-2 sont impliqués dans l'adressage du zymogène au noyau. Une première NLS bipartite est localisée en N-ter et s'organise en deux séquences tétrapeptidiques <u>RRSR</u> et <u>KKNR</u> séparées de 15 acides aminés. Cette NLS forme la première hélice_{α} du domaine CARD impliquée dans l'accumulation en spots et en filaments de CASP-2 dans le noyau. Une seconde séquence localisée en C-ter du pro-domaine, semblable à la NLS de c-myc, est placée entre les acides aminés 131 et 143 (PLYKKLRLSTD) où la proline et l'aspartate délimitent un centre basique. Cette séquence est essentielle à l'import nucléaire de pc-2 par α/β importine. Les deux NLS présentent au sein du pro-domaine collaborent pour permettre une plus grande polyvalence dans la régulation de l'importation nucléaire de CASP-2 (Colussi P.A. et al., 1998; Paroni G. et al., 2002; Logette E et al., 2003; Kitesvka T. et al., 2009).

B. Biochimie de la Caspase-2

1. Activation

Dans la cellule, la CASP-2 est activée en réponse à de nombreux facteurs tels que : les stress génotoxiques, l'activation des récepteurs de mort, les stress du réticulum endoplasmique, les variations du métabolisme et bien d'autres.

1.1. Activation par dimérisation

Comme les autres Caspases, et plus particulièrement les Caspases initiatrices et inflammatoires, CASP-2 est synthétisée dans la cellule, sous forme de zymogène monomérique catalytiquement inactif, p51. La séquence de pc-2 s'organise en un long prodomaine, abritant un domaine d'interaction CARD, suivi d'une large sous-unité (p19) et d'un *linker* qui lie la petite sous-unité, p12. L'association de p19 et p12 forme le domaine catalytique Caspase (**Figure 30**) (Baliga B.C. *et al.*, 2004 ; Aksenova V.I. *et al.*, 2012).

La dimérisation est un événement clé requit pour l'activation de CASP-2 (Bouchier-Hayes L. *et al.,* 2009). En effet, l'association de deux monomères p51 par les domaines CARDs, permet la formation d'un dimère partiellement actif capable de s'autocliver au niveau de l'Asp-333. Le clivage au niveau de ce résidu connu pour être le premier site de clivage de CASP-2, a deux conséquences pour le dimère. D'une part, il induit des changements conformationnels au niveau du site actif qui permettent d'accroître l'efficacité catalytique. D'autre part, le clivage permet la stabilisation du dimère en solution. Par conséquent cette étape de maturation est nécessaire à l'obtention d'une enzyme stable totalement active, mais n'est pas indispensable pour l'activation de l'enzyme. D'autres processus de maturation impliquant le clivage par la CASP-3 au niveau d'Asp-169 et Asp-347 peuvent également survenir et permettraient alors une amplification du signal suite à l'activation de CASP-3 dans les processus apoptotiques (Read S.H. *et al.,* 2002 ; Dostyn L. *et al.,* 2014 ; Bouchier-Hayes L. *et al.,* 2012).



Figure 30. Modèle proposé pour l'activation de CASP-

Comme les Caspases initiatrices et inflammatoires la pc-2 est synthétisée sous forme de monomère inactif, p51, dans la cellule. Le zymogène est formé de trois domaines, qui comprennent un long prodomaine qui abrite un domaine d'interaction CARD, suivi du domaine catalytique formé par les grande et petite sous-unité, p19, p12. L'étape clé de l'activation de CASP-2 est une dimérisation par association de domaines CARDs de deux monomères. Le dimère partiellement actif résultant de cette association est capable de s'autocliver au niveau de D333 pour permettre l'obtention d'un dimère totalement actif, stable en solution. D'autre processus de maturation peuvent avoir lieu, notamment le clivage par CASP3 au niveau de D347 et D169. Les sites de maturation son indiqué par les flèches et la Cystéine catalytique est identifiée en rouge par une astérisque (Baliga B.C. et al., 2004).

1.2. Plateforme d'activation

In vitro et à de fortes concentrations, les monomères de CASP-2 s'associent facilement, en revanche les taux endogènes de CASP-2 requièrent la présence de plateformes de recrutement pour accroître la concentration locale en zymogène afin de faciliter leur activation selon le modèle de dimérisation induite par proximité (Baliga B.C. *et al.*, 2004). Une importante avancée a été faite lorsque Read S.H. *et al.*, 2002 ont démontré que la CASP-2 était activée dans un complexe de haut poids moléculaire, semblable à l'Apoptosome et aux autres plateformes d'activation des Caspases initiatrices. Le recrutement de la CASP-2 au sein de ce complexe est dépendant d'une protéine adaptatrice RAIDD (*RIP-associated Ich-1/CED homologous protein with Death Domain*) et de PIDD1 (*p53-induced protein with a death domain 1*) (Duan H. *et al.*, 1997). L'association de ces protéines forme le PIDDosome décrit par le laboratoire de Jürg Tschopp en 2004. Tout comme l'Apoptosome, le DISC et les inflammasomes, le PIDDosome induit la dimérisation induite par proximité et par conséquent l'activation de CASP-2.

1.2.1. PIDDosome : Bifurcation entre la mort et la survie cellulaire

PIDD 1 a été initialement identifié comme gène cible du facteur de transcription p53, ou tumor protein 53, PIDD 1 étant ainsi impliqué dans l'apoptose induite par p53. PIDD 1 est une protéine de 910 acides aminés (100 kDa), sa région N-ter contient sept motifs LRRs, suivi de deux domaines ZU-5 et d'un *Death Domain* en C-terminal. PIDD1 est exprimée de manière

ubiquitaire avec un taux plus élevé au niveau de la rate ; Par ailleurs son expression est élevée dans les cellules qui expriment p53. Outre une régulation transcriptionnelle fine en réponse à des dommages à l'ADN, l'activation de PIDD 1 est également contrôlée par un second mécanisme d'auto-clivage *post*-traductionnel. Ainsi, un premier auto-clivage de PIDD au niveau de Phe-445/Ser-446 donne lieu à un fragment N-ter de 48 kD, PIDD-N (1-445) et d'un fragment C-ter de 51 kD, PIDD-C (446-910). Ce dernier est clivé au niveau de Phe-587/Ser-588 pour produire un dernier fragment de 37 kD, PIDD-CC (588-910), le devenir du dernier fragment de 14kD n'ayant pas été caractérisé. Ces étapes de clivage déterminent le devenir de la cellule, puisque, PIDD-C favorise la survie cellulaire en recrutant RIP1 et NEMO tandis que PIDD-CC permet l'activation de la CASP-2 pour conduire à la mort par apoptose suite à un stress génotoxique (**Figure 31**) (Tinel A. *et al.,* 2007 ; Jang T-h. *et al.,* 2013 ; Sladky V. et al., 2017).





survie ou à la mort cellulaire par apoptose.

Suite à sa synthèse, PIDD 1 est dans une conformation favorable à une auto-protéolyse au niveau de Ser-446. Le clivage permet la libération de deux fragments N-ter et C-ter, respectivement PIDD-N et PIDD-C (1). Un léger changement de conformation de PIDD-C permet l'activation du site de clivage au niveau de Ser-588 qui permet la libération de PIDD-CC (2). Ce second évènement de clivage est régulé par d'autres mécanismes qui sont associés au degré de gravité des dommages à l'ADN (3). Les deux clivages de PIDD 1 permettent la formation de deux fragments avec des fonctions distinctes. PIDD-C est capable de lier RIP1 et NEMO pour permettre l'activation de la voie NFkB. Tandis que PIDD-CC recrute RAIDD qui a son tour permet le recrutement et l'activation de CASP-2 au sein du PIDDosome, pour conduire à l'apoptose. Ces deux voies de signalisations sont contrôlées par des senseurs du stress génotoxique dans la cellule. D'après Tinel A. *et al.*, 2007 et Sladky V. et al., 2017.

1.2.1.1. PIDD-CC : La voie de l'apoptose

La protéine RAIDD est une protéine adaptatrice bifonctionnelle qui possède un domaine CARD et un DD. Dans la cellule, RAIDD existe sous une forme ouverte, qui peut lier la CASP-2, qui est en équilibre avec une forme fermée, qui ne peut pas se lier à la CASP-2. En absence de stress, la forme repliée est majoritaire. En revanche, après un stress génotoxique, la forme ouverte est favorisée. De plus, dans ces conditions, les nombreuses lésions à l'ADN favorisent le clivage de PIDD-C en PIDD-CC qui conserve le domaine d'oligomérisation putatif ainsi que le DD qui présente une forte affinité pour RAIDD. Par conséquent, PIDD-CC s'associe à RAIDD par une interaction DD:DD qui permet la stabilisation de la forme ouverte de RAIDD d'une part et la formation du cœur du PIDDosome d'autre part. Dans sa conformation ouverte, RAIDD peut alors recruter CASP-2 au niveau du PIDDosome par interactions CARD:CARD. Des études structurales révèlent que le cœur du PIDDosome est formé de cinq PIDD-DD et de sept RAIDD-DD avec des angles d'orientation bien définis. Ce centre se divise en trois couches, 2 RAIDD-DD forment la couche supérieure (R6-R7), 5 RAIDD-DD (R1-R5) constituent la couche intermédiaire tandis que les 5 PIDD-DD définissent la couche inférieure (P1-P5) (Figure 32) Détail du cœur du complexe). Un modèle propose que les DD de PIDD et RAIDD s'organisent au centre de la structure pour permettre l'oligomérisation tandis que les régions N-ter de PIDD-CC ET RAIDD ainsi que la CASP-2 s'organisent à la périphérie du complexe. Au sein de ce complexe, la concentration locale en pc-2 est augmentée facilitant ainsi la formation de dimères ainsi que les clivages pour l'obtention d'une enzyme mature (Park H.Y. et al., 2007).

En fonction du type et du contexte cellulaire, il est à noter que PIDD peut être dispensable pour l'activation de la CASP-2. En effet, dans les neurones RAIDD est requis pour l'activation de CASP-2 mais PIDD est dispensable.



Figure 32. Organisation du PIDDOsome. Modèle rendant compte de l'organisation du PIDDosome pour l'activation de la CASP-2. Les DD de PIDD et RAIDD forment le cœur du complexe, encadrés par des pointillés rouges. Les domaines N-terminaux, de PIDD et de RAIDD sont en périphérie du cœur. Lorsque RAIDD est fixe à PIDD via une interaction DD:DD il est maintenu dans une forme ouverte capable de fixer le domaine CARD de CASP-2 par une interaction CARD:CARD, par conséquent lorsque le PIDDosome est formé par association de PIDD et RAIDD, ce dernier peut permettre le recrutement de CASP-2. Les molécules de CASP-2 sont représentées en dimère afin d'illustrer la dimérisation induite par proximité au sein du PIDDosome. Le détail du centre du complexe est représenté dans le rectangle en pointillé, la vue de côté montre une organisation en trois couches, avec 2 RAIDD-DD (vert et jaune), La couche intermédiaire est formée de 5 RAIDD-DD (rouge, violet, organe, magenta et rose). La couche inférieure contient 5 molécules de PIDD-DD. Le détail de la couche inférieure montre l'organisation des couches avec des angles de rotations bien distincts qui régissent l'assemblage du PIDDosome. D'après Park H.Y. et al., 2007

1.2.1.2. PIDD-C : La voie de la survie

En réponse à un stress génotoxique qui entraine la rupture des deux brins de l'ADN, PIDD-C est transloqué au noyau, où Il peut alors interagir avec RIP-1 et NEMO pour former le PIDDosome-NEMO (NF κ B *Essential Modulator*). La formation de ce complexe facilite la sumoylation de NEMO qui est requise pour sa phosphorylation par la Serine/Thréonine kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), activée en réponse aux dommages à l'ADN. NEMO subit enfin une étape de mono-ubiquitinylation qui avec la phosphorylation lui permet d'être exporté hors du noyau. Dans le cytoplasme, NEMO permet l'adressage de l'inhibiteur I κ B au protéasome pour sa dégradation, résultant en la libération et l'activation de NF κ B qui est alors transloqué dans le noyau pour permettre la transcription de gènes de survie et de l'inflammation (Tinel A. *et al.*, 2007).

Compte tenu de ces observations, PIDD agit comme un interrupteur entre la survie par activation de la voie NF κ B et l'apoptose par activation de la CASP-2. La régulation de ces deux voies alternatives dépend du clivage de PIDD. En effet, le ratio de PIDD-C et PIDD-CC varie dans les cellules exposées à des différents dommages à l'ADN. Un nombre limité de ruptures de l'ADN conduisent à l'activation de NF κ B par le fragment PIDD-CC tandis que des dommages plus importants vont entraîner le clivage de PIDD-C en PIDD-CC pour entraîner une mort

cellulaire par apoptose. Ainsi, la production des deux fragments régit le devenir de la cellule qui conduit par défaut à une voie de survie cellulaire et lorsque le processus de réparation échoue, la cellule entraîne l'activation de la voie pro-apoptotique par le biais de PIDD-CC et la CASP-2.

Ainsi, CASP-2 présente un mécanisme d'activation qui s'apparente à celui des CASP-8 et -9, la définissant comme une Caspase initiatrice.

1.2.1.3. D'autres voies d'activation ?

Il existe des mécanismes d'activation de la CASP-2 indépendant du PIDDosome chez les mammifères. En effet, il semblerait que la dimérisation et par conséquent son activation pourrait survenir en l'absence de plateforme d'activation. La dimérisation de CASP-2 pourrait être expliquée par une augmentation locale de la concentration en zymogène et/ou dû à des modifications *post*-traductionnelles (acétylation en N-ter) qui pourraient favoriser son activation. Par exemple, en réponse à un efflux de K⁺ où à un choc de température qui induit une agrégation de protéine.

Un autre mécanisme d'activation de CASP-2 en lien avec l'induction de l'apoptose implique des acteurs des voies intrinsèque et extrinsèque. Dans ce mode d'activation le signal de dommages à l'ADN est guidé par p53 qui permet l'activation du récepteur Fas à la membrane et la formation du DISC. Il s'en suit le recrutement de FADD, de CASP-8 et de manière surprenante, de CASP-2. À ce stade, la CASP-2 et CASP-8 sont responsables du clivage de BID en tBid actif pour induire la PMEM et l'activation de l'apoptose. Dans ce mode d'activation, l'activation de CASP-2 pourrait renforcer une activation modérée de la CASP-8, tel que mis en évidence dans les cellules de types II des patients atteints du syndrome de Barth, maladie génétique liée au chromosome X. Ainsi, la CASP-2 pourrait accentuer les dommages à la mitochondrie pour renforcer le processus d'apoptose.

Enfin, il a été montré récemment que lors des dommages à l'ADN la CASP-2 est activée au sein de plates-formes localisées dans le cytoplasme et le noyau. La localisation différentielle des plates-formes d'activation semble être déterminée par PIDD car PIDD ne pourrait être nécessaire à l'activation que dans le noyau. Dans cette étude, Ando K. *et al.,* en 2017 ont montré que la phosphoprotéine nucléophosmine (NMP1) était directement et spécifiquement responsable de l'assemblage du PIDDosome dans le noyau, un événement essentiel pour l'apoptose issue de l'activation du PIDDosome suite à des dommages à l'ADN. Ils ont proposé un modèle où deux plates-formes d'activation pour la CASP-2 existaient, l'une dans le

cytoplasme ou le noyau indépendante de PIDD qui nécessite toutefois la présence de RAIDD tandis que l'autre, dans le noyau, seulement requiert PIDD. En conclusion de cette étude, ils avancent que l'assemblage du PIDDosome en réponse à des dommages à l'ADN est régulé par la présence et la localisation de NMP1. En plus, CASP-2 est également recrutée sur une plateforme distincte, dans le cytoplasme et qui s'avère être indépendante de PIDD (Krumschnabel G. *et al.*, 2009).

2. Structure et Catalyse

2.1. Organisation générale

La structure de CASP-2 comprend deux copies de monomères p19/p12. L'organisation générale est la même que pour les autres Caspase avec un cœur formé de 12 brins β centraux organisés en deux feuillets tête-bêche, entourés de quatorze hélices_{\alpha}. En termes d'identité de séquence la CASP-9 est le membre le plus proche de la CASP-2. De plus, la CASP-2 présente une longue extrémité structurée N-terminale de la large sous-unité p19, une propriété partagée uniquement avec la CASP-1. Cette dernière, comme la CASP-2 présente un pont disulfure qui permet de stabiliser cette extension. L'édifice global est maintenu par des interactions au travers de l'interface de dimérisation, essentiellement entre les résidus des brins β centraux, portés par les petites sous-unités p12.

2.2. Structure

2.2.1. Topologie du site actif

Au sein du dimère, chaque monomère de CASP-2 possède un site actif, contrairement à la CASP-9 où une gêne stérique entre les résidus Tyr-331 et Phe-390 empêche la formation de deux sites actifs fonctionnels au sein du dimère (Renatus M. et al., 2001). En **Figure 12C** la liaison du site actif avec l'inhibiteur Ac-LDESD-CHO révèle les détails de l'interaction entre les sous-site de l'enzyme et l'inhibiteur. La composition du sous-site S1 est strictement conservé entre Caspase, compte tenu de la spécificité stricte de clivage après un Asp en P1. La chaîne de l'Asp est enfouie dans une poche profonde, chargée positivement et est stabilisée par des interactions électrostatiques avec les Arg-179 et Arg-341 ainsi que par liaison hydrogène avec Gln-283. L'oxygène du carbonyle en C-ter interagit avec le groupement imidazole de l'His-237 ainsi qu'avec le proton de l'amide de la Gly-238 qui forme en partie le trou oxyanion. La poche S2 de l'enzyme n'est pas restrictive et tolère une grande variété de chaînes latérales,

115

son implication dans la reconnaissance du substrat est donc considérée mineure.

La majorité des Caspases accommodent préférentiellement un glutamate en P3 qui est stabilisé par interaction électrostatique avec l'Arg-341.

La poche S4 est décrite comme la plus sélective et par conséquent la plus déterminante pour la spécificité de substrat. En tant que Caspase du groupe II, CASP-2 tolère uniquement un Aspartate en P4. Le sous-site S4 de CASP-2 forme un tunnel très étroit où les deux oxygènes du carboxyle forme des liaisons hydrogènes avec Tyr-382, Asn-342, Trp-348 et par l'intermédiaire d'une molécule eau ordonnée avec Glu-380 et Arg-381 (**Figure 12C**).

Pour la CASP-2 la reconnaissance d'un résidu en P5 joue un rôle crucial dans la catalyse, contrairement aux autres Caspases. Une analyse de surface du site actif de CASP-2 a révélé une extension du site de liaison du substrat en N-ter formant ainsi un sous-site de reconnaissance supplémentaire qui permet d'accommoder un cinquième résidu. La poche hydrophobe S5 est formée par la chaîne latérale de Pro-385 et du groupement phényle de Tyr-383. Cette composition résulte en une préférence pour un petit résidu hydrophobe en P5. Au sein de cette poche, la bonne orientation du résidu est assurée par l'établissement de deux liaisons hydrogènes établies entre les groupes amino- et carboxy- du résidu en N-ter de l'inhibiteur avec les protons de l'amide de la chaîne principale et de l'hydroxyle de Thr-343. Ces observations font de Thr-343 et Tyr-383 des acides aminés essentiels pour la reconnaissance du résidu en P5 du substrat (Schweizer A. et al., 2003).

2.2.2. Cas de l'interface de dimérisation

Une propriété unique à la CASP-2 est la présence d'un pont disulfure au niveau de l'interface de dimérisation. En tout, quatre résidus cystéine, conservés, sont alignés au travers de l'interface. La paire centrale, Cys-390 (ne suit pas la convention de numérotation de CASP-1) et Cys-390' (« ' » désignant les résidus portés par le second monomère) est engagée dans un pont disulfure enfouis au cœur de l'interface, tandis que Cys-329 et Cys-329' ne forme pas de pont avec leur voisins respectifs Cys-390 et Cys-390' bien que la géométrie de l'interface le permette. Toutefois, ce pont disulfure ne semble pas être impliqué dans la dimérisation et la stabilisation du dimère mais pourrait constituer un pont allostérique qui permettrait de réguler l'activité CASP-2 avec des effets à distance sur le site actif (Schweizer A. et al., 2003 ; MacKenzie S.H. *et al.*, 2012).

2.3. Mécanisme catalytique : La Caspase-2 en action

Pour expliquer la catalyse Tang Y. *et al* en 2011 ont suggéré un mécanisme en trois étapes : activation de l'enzyme, liaison du substrat et formation d'un intermédiaire tétraédrique suite à l'attaque nucléophile par la cystéine catalytique.

De subtils changements de conformations sont à noter pour la préparation de la CASP-2 pour la catalyse. Ces modifications se concentrent essentiellement au niveau des quatre boucles qui forment le site actif. Dans la structure en absence d'inhibiteur ou apoenzyme les boucles L1, L2, L3 et L4 sont flexibles et non structurées et Glu-217 (ne suit pas la convention de numérotation de CASP-1) porté par la boucle L1 forme un pont salin avec l'Arg-378. En revanche dans la forme complexée de l'enzyme avec l'inhibiteur, le pont salin est rompu et permet l'orientation de l'Arg-378 dans le sous-site S1. Ces observations suggèrent donc que la rupture du pont salin et l'organisation des boucles dans une configuration active surviennent à l'arrivée d'une molécule de substrat. La fixation des molécules de substrat se fait de manière séquentielle, c'est à dire qu'une molécule de substrat se fixe à un seul site actif, bien que l'autre site non occupé soit dans une conformation active également. Cela signifie que la fixation d'une molécule de substrat au niveau du second site actif ne se fait pas de manière coopérative puisque le site se trouve déjà dans une conformation active. Lorsque les deux sites actifs sont occupés l'attaque nucléophile de la cystéine sur le carbonyle du substrat permet la formation d'un intermédiaire tétraédrique, l'hydrolyse peut donc avoir lieu.



Figure 33. Modèle suggéré pour l'initiation de la catalyse pour CASP-2.

Représentation schématique reprenant les étapes de la catalyse. Dans la forme libre, les boucles L1, L2, L3 et L4 qui forment le site actif sont flexibles et désordonnées. Au cours de l'arrivée d'une molécule de substrat est associée à la réorganisation des boucles ainsi qu'à la rupture du pont salin. Ensuite, la liaison de deux molécules de substrat se fait de façon séquentielle et non coopérative. Enfin, l'attaque nucléophile par la cystéine catalytique permet la formation d'un intermédiaire tétraédrique.

3. Substrats endogènes

Selon la classification des Caspases établie par N. Thornberry en 1997, la CASP-2 appartient aux groupe II, la regroupant ainsi avec les Caspases exécutrices, CASP-3 et -7. Contrairement aux autres Caspases qui reconnaissent et clivent leurs substrats en reconnaissant un motif tétrapeptidique, la CASP-2 a besoin de reconnaître un motif pentapeptidique pour exercer son activité de clivage de manière optimale. D'ailleurs, la séquence préférentiellement reconnue par la CASP-2 est le motif VDVAD, qui est aussi reconnu par les Caspases du groupe II (CASP-3 et -7) auquel elle appartient.

Le facteur de transcription CUX-1 (CUT-like homeobox 1) est efficacement clivé par les CASP-2, -3, -7, -8, -9 et -10 mais pas par la CASP-6. Cette protéolyse résulte en la perte de deux domaines de répression permettant la transcription de gènes du cycle cellulaire qui entraîne l'entrée en phase S, phase de réplication de l'ADN (Truscott M. et al., 2007). La Golgin-160 est une protéine de l'appareil de Golgi qui joue un rôle structural dans cet organite. Bien que Golgin-160 soit clivée 20 fois moins efficacement que CUX-1 la proportion de CASP-2 résidant au niveau de l'appareil de Golgi fait que le clivage de Golgin-160 est initialement dépendant de la CASP-2 (Mancini M. et al., 2000). Par ailleurs, elle est également clivée par CASP-3 et -7 à des étapes plus tardives de l'apoptose. Le clivage de la Golgin-160 par CASP-2 contribuerait au démantèlement de l'appareil de Golgi au cours de l'apoptose. La CASP-2 peut également cliver BID en tBID pour entraîner sa translocation à la mitochondrie et provoquer la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (PMEM) pour aboutir au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Cependant la CASP-2 clive bien moins efficacement BID que CASP-8 mais ce clivage pourrait s'avérer nécessaire en fonction du contexte cellulaire (Guo Y. et al., 2002; Yin X.M. et al., 2006). Par exemple, BID et CASP-2 sont tous deux requis pour une induction de l'apoptose suite à un stress du réticulum endoplasmique (RE). L' α II spectrine est une protéine de la membrane plasmique qui peut être clivée par la CASP-2 (Rotter B. et al., 2004). Sa protéolyse au cours de l'apoptose conduit à une déstabilisation du cytosquelette. CASP-2 peut également cliver la protéine Kinase RIPK-1, qui est responsable de l'activation de la voie NF- κ B en réponse au TNF α ainsi qu'aux dommages à l'ADN. Le clivage de RIPK1 résulte en une inhibition de la voie de survie cellulaire, levant ainsi le blocage de l'expression des gènes pro-apoptotiques (Guha M. et al., 2010). Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) qui joue un rôle dans le contrôle de l'expression de p53 ainsi que d'autres protéines via l'ubiquitinylation est aussi une cible de CASP-2. Il a été démontré dans les

cellules cancéreuses humaines du poumon que CASP-2 hydrolyse Mdm2, au niveau du motif FDVPD₃₆₇ permettant la libération du domaine de liaison à p53 et du domaine RING responsable de l'ubiquitinylation. Le fragment p60 résultant de ce clivage entre en compétition avec Mdm2 pour la fixation à p53. L'action de CASP-2 à ce niveau permet une augmentation des niveaux de p53, responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Oliver T.G et al., 2011). La CASP-2 peut également cliver iCAD, ayant pour conséquence une activation de CAD qui peut alors participer à la fragmentation de l'ADN en exerçant son activité de DNAse (Dahal G.R ; et al., 2007). Dans ce processus CASP-3 est en revanche plus active. CASP-2 peut également cliver cASP-7 mais à pH inférieur à 7, par conséquent ce clivage pourrait ne pas avoir lieu en conditions physiologiques. En plus de ces protéines, la CASP-2 clive de nombreux autres substrats tels que : desmoplakine, une protéine du cytosquelette ; PKC δ ; HDAC 4 ; Sirt1 ; BAD (Kitevska T. *et al.*, 2009 ; Aksenova V.I. *et al.*, 2012 ; Miles M.A. *et al.*, 2017). Enfin, la CASP-2 est également capable de cliver l'Huntingtine au niveau de l'Asp-552 (Hermel E. et al., 2004). L'ensemble des substrats biologiques de la CASP-2 sont répertoriés en **Table 4**.

Substrats	Site de clivage	Activité après clivage
CUX-1	Asp-1320; Asp-1336; Asp-1339;	Accélération de l'entrée en phase S
	Asp-1351	
Golgin-160	Asp-59	Fragmentation du complexe de Golgi
BID	Asp-60	PMEM
Pc-2	Asp-169 ; Asp-333 ; Asp-347 ;	Activation
Pc-7	Not mapped	Activation
iCAD	Asp-117	Fragmentation de l'ADN
Huntingtin	Asp-552	Dégradation en produits cytotoxiques,
		dégénérescence des tissus nerveux.
Desmoplakin	Not mapped	Élimination cytosquelette
lphaII spectrine	Asp-1158	Déstabilisation cytosquelette
HDAC 4	Asp-289	
ΡΚϹ δ	Not mapped	Déstabilisation des lamines nucléaires et
		inhibition de DNA-PK expression
PARP-1	Asp-214	Inactivation des réparations de l'ADN
BAD	Not mapped	Induction de l'apoptose
RIP1	Not mapped	Inhibition de la voie NF-κB
Mdm2	Asp-367	Perte du domaine RING, liaison à p53 et
		stabilisation
Sirt1	Lys-49	Activation CASP-2

Table 4.	Substrats	de CASP-2
----------	-----------	-----------

C. Caspase -2 : Rôles Biologiques

1. Souris constitutivement déficientes en Caspase-2

La CASP-2 est intimement liée à CED-3 (C. elegans) et à DRONC (D. melanogaster). Puisque des mutations de ced-3 et Dronc conduisent à une abolition de la mort cellulaire programmée, il était attendu que les souris constitutivement déficientes en CASP-2 présenteraient des phénotypes rendant compte d'une inhibition de la mort cellulaire. Cependant, deux lignées de mutants ne présentaient aucuns phénotypes majeurs rendant compte d'une perte de la CASP-2. En effet, les souris se développent normalement et sont fertiles avec une apoptose identique aux animaux contrôles au niveau des neurones et des thymocytes. Toutefois, des phénotypes légers sont associés à la délétion de la CASP-2. Par exemple, une réduction du nombre de motoneurones au stade néonatal ; une augmentation du nombre d'ovocytes chez les souris constitutivement déficientes en CASP-2 femelles, et une résistance de ces ovocytes à l'apoptose induite par la doxorubicine, par ailleurs les lymphocytes B sont également partiellement résistant à la mort induite par le granzyme B et la perforine. De plus, les neurones prélevés des souris CASP-2^{-/-} sont résistants à la mort induite par le peptide β amyloïde (Troy C.M. et al., 2000 ; Jean Y. Y. et al., 2013), ou par une carence en NGF (Troy C.M. et al., 1997 ; Bergeron L ; et al., 1998 ; Vigneswara . Les souris CASP-2-/- montrent également des signes de vieillissement prématuré avec notamment une accumulation de dommages oxydatifs, ce qui pourrait là aussi suggérer un rôle de CASP-2 dans la mort cellulaire induite par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Zhang Y. et al., 2007 ; Braga M. et al., 2008; Lopez-Cruzan M. et al., 2013; Wilson C.H. et al., 2015; Makwana M. et al., 2017) Les fibroblastes embryonnaires de ces souris (MEFs) présentent un délai ou une réduction dans la réponse apoptotique suite à un traitement avec des agents cytotoxiques et présentent une augmentation des dommages à l'ADN suite à une irradiation, suggérant que la perte de la CASP-2 favorise la survie de cellules avec ce type d'altérations (Dawar S. et al., 2017). De plus, lorsque les MEFs CASP-2 -/- sont transformés, avec des oncogènes tels que Ras et EA1 (Adenovirus early region 1A) et implantés dans des souris nudes, au système immunitaire défaillant, le développement de tumeur agressive est rapide. Ces modifications « mineures » chez ces souris mutantes laissent à penser que la CASP-2 a des fonctions redondantes mais qu'elle joue aussi un rôle important dans un nombre considérable de voies de signalisation

qui peuvent être indépendante de l'apoptose (Bergeron L. *et al.,* 1998; Kumar S. 2009; Aksenova V.I. *et al.,* 2012).

2. Caspase-2, son rôle dans les processus apoptotiques

Bien que la CASP-2 soit l'un des premiers membres identifiés, son rôle dans les processus apoptotiques a longtemps été soumis à controverse. Bien que beaucoup d'études in vitro aient montré son implication dans la mort cellulaire induite par différents stress qui incluent p53, ERO, stress du RE, l'absence de phénotypes majeurs chez les souris CASP-2^{-/-} suggèrent des fonctions redondantes dans l'homéostasie cellulaire au cours du développement et dans les organismes adultes (Kumar S. 2009). Par ailleurs, il a longtemps été difficile de lui attribuer un rôle d'initiatrice ou d'exécutrice de l'apoptose. Pour cause, elle possède des propriétés propres à ces deux groupes de Caspases apoptotiques. D'une part, sa spécificité de substrat la classe parmi les exécutrices (Thornberry N. et al., 1997). D'autre part, la forme de son zymogène, avec un long pro-domaine contenant un motif d'interaction homotypique CARD, ainsi son mode d'activation qui nécessite une étape de dimérisation, pouvant se faire au niveau de plateforme d'activation en font une Caspase initiatrice. Contrairement aux autres Caspases initiatrices CASP-2 ne clive pas directement les Caspases exécutrices, en revanche elle les active indirectement en agissant en amont de la PMEM. En effet, suite à différents stress (dommages à l'ADN, déstabilisation du cytosquelette, ROS, choc de température) CASP-2 induit la PMEM en clivant et activant BID, qui induit à son tour l'activation de BAX et/ou BAK pour entraîner la libération de cytochrome c dans le cytosol et par conséquent l'apoptose (Guo Y. et al., 2002 ; Kumar S. et al., 2002 ; Lassus P. et al., 2002 ; Bonzon C. et al., 2006) Ces observations associées au fait que l'apoptose induite par la CASP-2 soit bloquée par la protéine pro-apoptotique Bcl-xL permettent de placer la CASP-2 en amont de la PMEM, et la classe donc parmi les Caspases initiatrices. Toutefois, en fonction du type ou du contexte cellulaire la CASP-2 peut être également activée en aval de la PMEM, par la CASP-3 notamment suite à un traitement à l'étoposide ou une irradiation aux rayons- γ (Bouchier-Hayes L. et al., 2010).

La présence de la CASP-2 au niveau de la mitochondrie est depuis toujours soumise à controverse (Bouchier-Hayes L., et al., 2010 ; Paroni G. et al., 2002 ; van Loo G et al., 2002). Dans une étude publiée en 2016, Lopez-Cruzan M. et al., ont démontré que la Casp-2 existait dans ce compartiment en comparant les fractions de tissus issues d'animaux CASP-2^{-/-} et

sauvage. De plus, dans des lignées de fibroblastes NIH 3T3 transfectées pour suivre l'activité CASP-2, l'ajout de 100 μM tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) pendant 1h induit le clivage de la CASP-2 dans la mitochondrie. Ils ont donc démontré au travers de cette expérience que la CASP-2 était active dans cet organite. Ils ont enfin démontré que la CASP-2 était un médiateur de l'apoptose dans des fibroblastes primaires traités avec des générateurs de ROS tels que la roténone, l'oligomycine et antimycine A. Toutefois, la CASP-2 n'est pas impliqué dans la mort de ces cellules induites avec de l'étoposide.

3. La Caspase-2 comme suppresseur de tumeur ?

Les MEFs CASP-2 ^{-/-} sont résistantes à la mort induite par des agents anticancéreux ainsi que par des irradiations, qui créent des dommages à l'ADN. De plus, ces cellules présentent des défauts de réponse apoptotique suite à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, avec causés par des dommages à l'ADN. Dans des cas particuliers, la délétion de CASP-2 résulte en une capacité des cellules à acquérir des phénotypes de cellules transformés qui peuvent en plus devenir tumorales (Ho L.H. *et al.,* 2009).

3.1. Des preuves issues des modèles animaux

Bien que la délétion de la CASP-2 ne soit pas suffisante pour induire une tumorigénèse spontanée chez la souris, il s'avère que croisés avec un fond oncogénique, les fonctions de la CASP-2 dans la tumorigénèse deviennent apparentes. Par exemple, une délétion de CASP-2 chez des souris transgénique Eµ-*Myc*, accélère la lymphomagénèse, constituant une première preuve quant à une fonction de suppresseur de tumeur pour CASP-2. En utilisant des modèles de tumorigénèse induit, il a pu être démontré que CASP-2 ne parvient pas à prévenir de la tumorigénèse induite par une irradiation ionisante suggérant donc que la CASP-2 n'est pas un suppresseur de tumeur général mais pourrait agir de la sorte dans des contextes particuliers Ho L.H. *et al.*, 2009. Par conséquent, les fonctions de la CASP-2 dans la suppression de tumeur est évidente dans des conditions de stress oncogéniques mais ne permet pas d'empêcher la tumorigénèse au moment de sa mise en place. Ce qui explique que les souris CASP-2^{-/-} ne développent pas de tumeurs spontanément mais que sa délétion potentialise la tumorigénèse chez des souris sujettes au tumeurs (Puccini J. *et al.*, 2013).

3.2. Généralités sur la régulation du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire finement régulée par une série de point de contrôle afin de protéger contre des dommages à l'ADN induit par des stress au niveau de : la réplication,

du métabolisme, des radicaux libres, par des irradiations ionisantes ainsi que par des composés génotoxiques. L'activation de es points de contrôle est dépendante de l'activité de kinases cyclin-dépendante (CDKs) ainsi que par des inhibiteurs de ces enzymes, tels que p19 et p16. Par conséquent, une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la mitose ou un nombre trop important de lésions de l'ADN induisent une réponse de dommage à l'ADN (DDR). Cette DDR active les points de contrôle du cyle cellulaire et conduit soit à une entrée en sénescence des cellules pour permettre la réparation soit à la mort par apoptose, pour permettre l'élimination des cellules trop endommagées. ATM (*Ataxia telangiectasia-mutates*), ATR (Rad3-related protein) et les *checkpoint* kinases (Chk1, Chk2) sont essentielles pour l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. En effet, l'activation d'ATM/ATR entraîne la phosphorylation et l'activation de p53 est finement régulée par phosphorylation par ATM/Chk2. Ce complexe permet également la dégradation de Mdm2 qui maintenait p53 dans un état inactif par ubiquitinylation (Dorstyn L. *et al.,* 2012).

3.3. Mécanismes possibles de la suppression de tumeur par Caspase-2

3.3.1.1. La Caspase-2, point du contrôle du cycle cellulaire ?

Le lien entre CASP-2 et régulation du cycle cellulaire a été proposé suite à la mise en évidence d'une interaction entre CASP-2 et Cyclin D3, un régulateur positif de la transition G1/S, dans le noyau. Cette interaction semblait stabiliser la CASP-2 et pouvait constituer un lien entre apoptose et cycle cellulaire (Mendelsohn A.R. et al., 2002).

Il a pu être montré que la phosphorylation de CASP-2 au niveau de Ser-340 par le complexe Cdk1/Cyclin B1 prévient de la mort cellulaire en réponse à une catastrophe mitotique, en empêchant l'activation de la CASP-2 (Andersen J.L. et al., 2009).

3.3.1.2. Réponses aux dommages à l'ADN

La cellule emploie de nombreux mécanisme pour protéger l'ADN des stress génotoxiques, par exemple en passant par p53 qui active la transcription de protéine de dommages à l'ADN. Cependant, si les dommages sont irréparables p53 initie l'apoptose. Pour cela il agit en régulateur transcriptionnel pour stimuler l'expression des facteurs proapoptotique BAX, PUMA et NOXA tout en réprimant l'expression des IAPs, pour favoriser l'apoptose par la voie mitochondriale (Venderova K. *et al.*, 2012).

Suite à des dommages à l'ADN l'activation de la CASP-2 peut conduire à l'apoptose par l'intermédiaire du clivage du BID en association ou non avec une *up*-régulation de BIM. Dans des cellules exprimant p53, le clivage de Mdm2 par CASP-2, libère p53 en prévenant de sa dégradation et favorise ainsi l'expression d'autre facteurs pro-apoptotique tels que NOXA et PUMA (Villunger et al., 2003). L'accumulation de ces protéines entraîne l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, qui passe par la PMEM (Dorstyn L. et al., 2012).

Une étude menée sur le poisson zèbre a mis en évidence un processus apoptotique conservé indépendant de la voie mitochondriale et des récepteurs de morts. Ce processus dépendant de ATM/ATR et de CASP-2 est déclenché par des dommages à l'ADN dans des cellules où l'activité de Chk1 est compromise et où p53 n'est pas activé. Par conséquent cette voie est mise en place exclusivement lors d'un traitement au IR et d'une inhibition de Chk1. Dans cette voie, ATM répondrait aux dommages subit par l'ADN tandis qu'ATR serait un senseur de l'inhibition de Chk1, en détectant un stress au niveau de la réplication par exemple. Cette voie ATR/ATM/CASP-2 pourrait constituer un mécanisme d'élimination des cellules présentant des lésions importantes de l'ADN en l'absence d'un contrôle de l'intégrité du génome, en l'occurrence l'inhibition de Chk1 (Puccini J. et al., 2013 ; Ando K. et al., 2012, 2017).

L'activation de cette voie pourrait aussi contribuer à la décision de survie (arrêt du cycle et réparation) ou de mort dans les cellules souffrant de dommages de l'ADN (S. Sidi *et al.,* 2008).

3.3.1.3. Maintien de la stabilité génomique - Aneuploïdie

Dans des modèles murins de lymphome, Puccini J. *et al.*, en 2013 ont démontré que la CASP-2 coopérait avec ATM pour supprimer l'instabilité génomique, le stress oxydant et la progression tumorale. L'implication de la CASP-2 dans la stabilité génomique est aussi renforcée par le fait que les cellules issues de lymphome de souris CASP-2^{-/-} et ATM^{-/-} soient aneuploïdes tandis que l'absence d'ATM seul dans les cellules tumorales ne provoque pas cette aneuploïdie.

Dans les cellules MEFs issues de souris CASP-2^{-/-} ayant subi des irradiations : des altérations de la réparation de l'ADN, de l'instabilité génomique ainsi que de l'aneuploïdie sont à noter (Miles M.A. *et al.,* 2017). En 2017, Dawar *et al.,* ont pu mettre en évidence que la CASP-2 était requise pour l'élimination des cellules aux profils mitotiques aberrants et que cette activité est associée à son activité catalytique. En effet, chez les souris mutantes CASP-2^{C320S}, la mutation de la cystéine catalytique en sérine entraîne une augmentation de la susceptibilité des cellules à l'aneuploïdie. Ils ont également pu démontrer que dans des système *ex vivo*

d'aneuploïdie sur cellules primaires ou dans des lignées cellulaires humaines, la délétion de CASP-2 conduit à une augmentation de la survie des cellules au profils mitotiques aberrants qui peuvent de surcroit devenir des cellules tumorales. L'activation de la CASP-2 semble survenir à un moment où un point de contrôle mitotique est corrompu. D'ailleurs, la perte de l'activité CASP-2 affecte la mitose au niveau de la transition pro-métaphase – métaphase qui incluent la formation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes sur ce fuseau. La CASP-2 pourrait limiter l'aneuploïdie en clivant et activant BID, en agissant ainsi en amont de la PMEM et de l'activation des CASP-3 et -9. Et son activation semblerait être indépendante de PIDD et RAIDD. Ils proposent donc que la mort induite par la CASP-2 participe à l'élimination efficaces de cellules présentant des défauts chromosomiques afin de limiter l'aneuploïdie *in vivo*.

La CASP-2 est également impliquée dans un mode de mort cellulaire induit par des mitoses aberrantes caractérisées de « catastrophes mitotiques ». Ce processus semble être important pour l'élimination des cellules aneuploïdes. La catastrophe mitotique est donc considérée comme processus de suppression de tumeur important pour le maintien de la stabilité génomique. CASP-2 pourrait donc être impliquée dans la mort de cellules devenues aneuploïdes suite à une catastrophe mitotique résultant d'une mauvaise ségrégation des chromosomes par exemple.

3.3.1.4. Perturbation du cytosquelette

Les résultats obtenus par Ho L. *et al.*, en 2008 indiquent que la CASP-2 est impliquée dans l'apoptose en réponse au traitement par des composés responsables de la déstabilisation du cytosquelette (docetaxel, paclitaxel, vincristine, cyto D). D'ailleurs ces observations corroborent avec le fait que les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique présentent de faibles taux de CASP-2 associé à une résistance à l'apoptose suite au traitement par de la Vincristine. L'apoptose médié par la CASP-2 suite à une déstabilisation du cytosquelette est dépendante de l'activation de BID et BAX. Dans ces modèle l'activation de la CASP-2 pourrait se faire au niveau du PIDDosome. Ensuite CASP-2 clive BID en tBID pour qu'il puisse aller activer BAX pour conduire à la PMEM, suivi du relargage de cytochrome *c* et de l'activation de la voie intrinsèque par formation de l'Apoptosome (**Figure 34**).



Figure 34. Les fonctions de la Caspase-2 dans la mort cellulaire.

Le stress cellulaire induits par des dommages à l'ADN, une déstabilisation du cytosquelette ou par la présence de ROS peuvent conduire à des voies d'activations alternatives pour la CASP-2. En effet, en réponse à des dommages au cytosquelette ou à la présence d'anion superoxyde, l'activation de la CASP-2 se fait en amont de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Suite à des dommages à l'ADN, la CASP-2 peut être activée par une voie dépendante de ATM/ATR par un mécanisme encore inconnu. Le complexe ATM/ATR peut également activer p53 et entraîner l'apoptose par activation de la transcription de protéines pro-apoptotiques telles que PUMA ou NOXA qui entraînent une PMEM at activation de la voie intrinsèque. Smac/DIABLO est libéré en même temps que le cytochrome *c* afin de réguler l'action des inhibiteurs endogènes des CASP-3, -7 et -9, facilitant ainsi la cascade d'activation des Caspases. Une fois activée la CASP-3 peut cliver et activer un nouveau pool de CASP-2 pour amplifier le signal apoptotique (Puccini J. *et al.*, 2013).

4. Caspase-2 et inflammation

Le rôle de la CASP-2 dans l'inflammation a été initialement proposé à partir d'une étude qui montrait une interaction inductible entre la CASP-2, *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) et RIPK1 pour permettre l'activation de NF-κB. Cette implication de la CASP-2 dans ce processus est indépendante de son activité catalytique mais dépend de son domaine CARD. Plus récemment des études *in vivo* et *in vitro* positionnent la CASP-2 comme nouveau modulateur de l'inflammation. En effet, l'absence de CASP-2 dans des cellules dendritiques infectées par *Brucella abortus*, résulte en des défauts fonctionnels qui incluent : la production de cytokine, la maturation de ces cellules, défaut de présentation de l'antigène, la réponse des lymphocytes T. Dans des études *in vivo* pour caractériser le rôle d'anti-âge de CASP-2, des souris CASP-2 ^{-/-} âgées présentent un stress-oxydant important et de manière intéressante

elles produisent un taux supérieur d'IL-1 β et d'IL-6, en comparaison aux animaux contrôles exposés à des générateurs d'ERO. Ces éléments semblent indiquer que la CASP-2 participe à la propagation du signal inflammatoire au travers de la régulation de la défense anti-oxydante (Songane M. *et al.*, 2018).

Trois protéines résidantes dans le RE sont des senseurs qui régissent la réponse aux stress du RE, IER1 α (Inositol-requiring enzyme 1); ATF6 (Activating transcription factor 6) et PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase). Les infections microbiennes sont de bons modèles pour l'étude des stress du RE et de l'inflammation car l'infection est souvent associée à un stress du RE. La souche RB51 de Brucella abortus est une souche moins virulente qui infecte les macrophages et cause un stress du RE conduisant à une forte réponse immunitaire. Dans une étude Bronner D.N et al., en 2015 ont démontré que le stress du RE induit par RB51 provoquait des dommages à la mitochondrie par une augmentation de la production d'ERO, conduisant à l'activation de NLRP3, indépendamment d'ASC et CASP-1, par un mécanisme dépendant d'IER1 α (Figure 35). De plus, CASP-2 est activée par un stress du RE ou par une infection avec RB51 et régule l'activation de CASP-1 (Bronner D.N. et al., 2013). Par conséquent, dans des conditions de stress du RE induite par une infection par RB51, NLRP3 pourrait faciliter le relargage du contenu mitochondrial ainsi que l'activation de l'inflammasome via l'activation de CASP-2. En effet, NLRP3 et CASP-2 entraîne une altération de la mitochondrie au travers du clivage et de l'activation de BID en tBID qui va à son tour activer BAX pour permettre la PMEM. La perméabilisation conduit alors à la libération de DAMPs mitochondriaux qui conduisent à l'activation de l'inflammasome. Les mécanismes par lesquels IER-1 conduit à une activation de CASP-2 dépendante de NLRP3 sont encore à élucider, mais NLRP3 pourrait interagir avec une protéine adaptatrice semblable à ASC via une interaction CARD:CARD. Cette voie de signalisation en condition de stress du RE place NLRP3 en amont de l'activation de CASP-2 et dévoile un mécanisme par lequel NLRP3 facilite l'altération mitochondriale pour activer l'inflammasome.



Figure 35. Le stress du réticulum suite à une infection par RB51 entraîne une activation de l'inflammasome par un mécanisme impliquant l'activation de CASP-2 par NLRP3. En condition de stress du RE suite à une infection par la souche RB51 de *Brucella abortus, IRE1* induit une augmentation de la production d'ERO au niveau de la mitochondrie qui entraîen alors le recrutement de NLRP3 au niveau de cet organite, conduisant au recrutement et à l'activation de CASP-2. Cette dernière clive et active BID pour entraîner le relargage de facteurs mitochondriaux, dont les DAMPs, par l'intermédiaire de l'activation de BAX. La libération de ces DAMPs mitochondriaux permet alors l'activation de l'inflammasome (Bronner D.N. *et al.*, 2015).

5. Caspase-2 et Stress oxydant

On parle de stress oxydant lorsqu'il y a (i) un excès de formation d'ERO (anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène) ou (ii) une réduction de la machinerie d'élimination des radicaux libres qui peut se traduire par une perte de l'activité des enzymes anti-oxydantes. La famille de protéine FoxO est un sous-groupe de la grande famille des facteurs de transcriptions. Chez les mammifères FoxO1, FoxO3a, FoxO4 et FoxO6 sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont l'autophagie. Les protéines FoxO régulent également la transcription de nombreux gènes antioxydant qui incluent les gènes codant notamment la super oxyde dismutase 2 (SOD2) et la catalase (Shalini S. *et al.,* 2012).

La CASP-2 est soumise à une régulation métabolique par le NADPH (ref), un cofacteur essentiel aux enzymes anti-oxydantes telles que la glutathion réductase (GSH-Px) et la *calmoduline dependant kinase II* (CaMK II). De plus, il semblerait que CASP-2 puisse réguler l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que les SODs, la catalase et les sestrines via la modulation de FoxO induisant par conséquent une régulation du taux d'EROs.

5.1. Phénotypes des souris CASP-2^{-/-}

Les souris CASP-2^{-/-} montrent des changements phénotypiques minimes qui incluent : une durée de vie maximale plus courte que les animaux contrôles bien que la durée de vie moyenne, elle, ne soit pas significativement différente, des traits de vieillissement prématurés avec des poils gris et qui ont tendance à tomber, une perte de poids nette ainsi qu'une

diminution de la masse osseuse chez les souris âgées CASP-2^{-/-}.(ref) Dans leurs travaux, Shalini S. *et al.,* en 2012 ont mis en évidence que l'augmentation d'EROs et de dommages oxydatifs en absence de CASP-2 contribuent à ces traits de vieillissement prématurés observé chez ces animaux. L'augmentation du stress oxydant chez ces animaux serait en parti la conséquence d'une activité réduite des enzymes anti-oxydantes SOD et GSH-Px, qui sont les enzymes clés du processus d'élimination des EROs, et des antioxydants sestrines causé par une diminution de l'expression de FoxO associé à une augmentation de l'expression de p53 chez les souris âgées. En effet, l'expression de FoxO1 et Fox3a est réduite chez ces animaux.

5.2. Le stress oxydant induit une apoptose Caspase-2 dépendante

La CASP-2 agit en initiatrice de l'apoptose en agissant en amont de la PMEM suite à une variété de stress cellulaire qui incluent le stress oxydant. D'ailleurs, l'accumulation d'anion superoxyde (O₂⁻⁻) entraîne une activation des CASP-2 et CASP-8 qui agissent de concert pour cliver et activer BID, pour qu'elle puisse à son tour aller activer BAK au niveau de la mitochondrie pour activer la voie intrinsèque (**Figure 34**) (Madesh M. *et al.,* 2009). Dans le processus d'apoptose des cellules musculaires, l'augmentation du stress oxydant peut entraîner l'apoptose *via* l'activation de CASP-2 qui à son tour active la voie intrinsèque par l'intermédiaire de l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Il est important de noter que le stress oxydant est également impliqué dans l'apoptose dans différents types cellulaires au cours du vieillissement. Une étude réalisée en 2008 par Braga M. *et al.,* met en lumière le rôle de la CASP-2 dans l'apoptose des cellules du muscle squelettique au cours du vieillissement. Ce processus de mort, implique l'activation de CASP-2 induite par le stress oxydant ainsi que la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique BCL-2 par JNK, au cours du vieillissement dans les cellules musculaires.

5.3. Caspase-2 et homéostasie osseuse en condition de stress oxydant

Dans les os, les ostéoclastes ont une durée de vie courte (2- 4 semaines) par conséquent, une altération qui prolonge leur durée de vie peut résulter en une réduction de la masse osseuse. Puisque ces cellules sont riches en mitochondries, l'organite producteur d'EROs, la voie intrinsèque de l'apoptose est favorisée pour induire la mort suite à une accumulation d'EROs. Dans une étude, Sharma R. *et al.*, en 2014 ont démontré que le stress oxydant induisait une induisait une augmentation des taux de CASP-2 dans les ostéoclastes. Ils ont également mis en évidence que l'absence de CASP-2 entraînait une augmentation du nombre

de cellules en prolongeant leur survie. *In vivo*, la perte de la CASP-2 induit une perte osseuse résultant en une fragilité des os, observée classiquement chez les souris CASP-2 ^{-/-}. Cette absence de la CASP-2 est également associée à une augmentation stress oxydant dans les os, conséquence d'une diminution de l'expression de SOD2 par exemple. Au niveau des ostéoclastes la CASP-2 pourrait avoir un rôle dual, d'une part l'*up*-régulation des antioxydants (activité SOD) suite à une exposition à des EROs et d'autre part, en induisant l'apoptose suite à des dommages oxydatifs. Un mécanisme d'action proposé est que les ERO endommagent les enzymes du métabolisme responsables de la production de NADH. De plus, la neutralisation des EROs consomment le NADPH. Ces modifications pourraient altérer les fonctions de CaMK II, inhibiteur de CASP-2. Il est également possible que l'altération de CaMK II diminue le seuil de sensibilité au stress oxydant pour l'activation de CASP-2 pour permettre l'apoptose des ostéoclastes. Ces observations permettent de conclure sur le fait que CASP-2 est impliquée dans le l'homéostasie osseuse au cours du vieillissement.

5.4. Répression de l'autophagie

5.4.1. Généralités sur l'autophagie

La macroautophagie est un processus d'adaptation induit par des stress, requis pour la survie des cellules eucaryotes. Au cours du processus d'autophagie une structure délimité par une enveloppe permet d'isoler une partie du cytoplasme de la cellule, c'est l'autophagosome. Ce dernier fusionne ensuite avec les lysosomes permettant la formation d'autolysosomes qui permettent la dégradation du contenu de ces vésicules. L'autophagie permet l'élimination de composés toxiques qui peuvent être recyclés pour réapprovisionner la cellule en nutriment ou en acides aminés. Il s'agit d'un processus très conservé. Dans la cellule, l'autophagie est réprimée par l'activation de MTOR (*mechanistic target of rapamycin*) qui implique la signalisation AKT ou protéine Kinase B et MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). En revanche, les régulateurs négatifs de MTOR tels que l'AMPK (AMP-actovated protein kinase) et la voie de signalisation TP53 favorisent l'autophagie. Les protéines ATG sont également impliquées dans le déclenchement de l'autophagie (Mizushima N et al., 2002 ; Yang Y.P. et al., 2005 ; Jung C.H. et al., 2010).

5.4.2. Mécanisme de la répression

Une étude de Tiwari M. *et al.,* en 2014 a permis de caractériser le rôle de CASP-2 en tant que répresseur de l'autophagie. Dans leur étude, la délétion de la CASP-2 conduit à un

augmentation du seuil basal de l'autophagie dans différents tissus (cortex cérébral) et types cellulaires (MEFs isolé, astrocytes, neurones, osteoclastes). Un rôle des Caspases avait déjà été mis en évidence dans l'autophagie, puisque CASP-8 agissait en régulateur de l'autophagie et l'inhibition de CASP-8 entrainait une mort par autophagie. La CASP-3 réprime l'autophagie suite à différents stress pour favoriser l'apoptose. En revanche la CASP-9 favorise l'autophagie. Leurs résultats ont montré que la perte de CASP-2 favorisée l'autophagie tout comme les CASP-3 et -8. Contrairement à la CASP-8, la délétion de CASP-2 ne résulte pas en une diminution de la survie, plutôt, en absence de CASP-2, et en présence d'un stress, l'autophagie favorise la survie sans affecter les taux de CASP-2. En présence de ROS, l'induction de l'autophagie par CASP-2 implique une répression de la voie MTOR et une activation de la voie AMPK. De plus, CASP-2 et TRP53 pourraient agir de concert via différentes voies pour moduler l'autophagie. CASP-2 contrôle également l'autophagie à l'aide de ATG5 et ATG7, puisque même de faibles taux de ces deux protéines sont suffisants pour induire l'autophagie en absence de CASP-2, suggérant ainsi une activation de la voie canonique de l'autophagie. Leur étude fait également référence à l'implication des MAPK, plus particulièrement MAPK14 et MAPK1/3 où MAPK14 réprime l'autophagie en empêchant la maturation des autophagosomes et MAPK1/3 est un activateur de l'autophagie. En absence de CASP-2, l'association d'un faible taux de MAPK14 active et d'un fort taux d'activation de MAPK1/3 pourrait agir ensemble pour coordonner l'autophagie. Leurs travaux ont également mis en évidence que l'absence de CASP-2 entraîne une augmentation des EROs, notamment l'anion superoxyde et non les taux de peroxyde, en amont de l'activation de l'autophagie. Ceci suggère que l'autophagie est régulée par les taux d'anions superoxyde.

6. Caspase-2 et Métabolisme

Dans leurs travaux, Wilson C.H. *et al.*, en 2017 et 2016 ont démontré que CASP-2 est un régulateur de l'homéostasie du glucose, indépendamment de l'insuline, ainsi que du métabolisme énergétique basal. CASP-2 semble également moduler la biologie des adipocytes et l'expansion de la graisse. La CASP-2 semble promouvoir l'obésité ainsi que la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). En effet, des sections de foie de patients atteints NASH présentent des taux anormalement élevés de CASP-2, avec des taux encore plus élevés pour des cas plus sévères. Ces observations corroborent avec les résultats obtenus sur les modèles animaux des NASH. Il semble donc qu'une hausse du taux de CASP-2 soit une cause plutôt

qu'une conséquence de cette pathologie puisque les foies des animaux CASP-2^{-/-} sont beaucoup moins affectés (Machado M.W. *et al.*, 2016).

Les souris âgées CASP-2^{-/-} présentent une réduction de la masse musculaire et graisseuse, elles ont également de plus petits adipocytes blancs, malgré des régimes riches en graisses ou en glucides, et une lipolyse augmentée dans le tissu adipeux suite à un jeûne, ainsi qu'une augmentation de l'autophagie dans les muscles squelettique et le foie suite au jeûne. Une différence entre le métabolisme des mâles et des femelles a aussi été identifiée. Le jeûne semble affecter beaucoup plus le métabolisme du foie chez les mâles que chez les femelles. Bien que les statuts de CASP-2 n'aient pas d'impact sur la tolérance du glucose chez les femelles, les mâles déficients en CASP-2 ont une meilleure tolérance au glucose en comparaison aux animaux sauvages. Cette différence pourrait s'expliquer par un *shift* de l'organisme sur l'utilisation du sucre.

Le jeûne force les animaux à obtenir l'énergie à partir de trois sources : le glycogène stocké dans le foie, puis les lipides des adipocytes et enfin les protéines du muscle. Chez les mâles uniquement, l'absence de CASP-2 résulte en une hausse de l'utilisation des lipides du tissus adipeux et pourrait expliquer la taille réduite des adipocytes. Au niveau cellulaire, l'autophagie est également utilisée en période de jeûne prolongé, à ce niveau, l'absence de CASP-2 favorise cette voie dans le foie et les muscles chez les deux sexes.

7. Caspase-2 et Vision

Une lésion du nerf optique entraîne une mort progressive des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC en anglais). La sévérité de ce processus est dépendant du type de lésions et de la distance de l'œil. Les RGCs transmettent les informations visuelles collectées par les photorécepteurs au cerveau *via* leurs axones dont l'association forme le nerf optique. La perte de ces cellules est une caractéristique des maladies ophtalmique qui résulte en une détérioration de la vision et une cécité, tel est le cas pour les glaucomes par exemple. Après une lésion du nerf optique les RGCs meurent par apoptose. Dans ce processus, la CASP-2 est spécifiquement activée. Chez le rat, clamper les axones des RGCs conduit à une perte de 60% des cellules en 7 jours, cependant l'injection en intravitreal d'un ARN interférent ciblant CASP-2 au moment de la création de la lésion prévient totalement de ces dommages. Avec un effet sur 12 jours. Dans des modèles plus sévères de lésion du nerf optique, l'axotomie des RGCs au niveau de l'oeil du rat entraîne une perte de 90% des RGCs en 14 jours. En revanche,

seulement 75 % des RGCs sont perdus pour des yeux traités avec le siRNA CASP-2 (Ahmed Z. *et al.,* 2011 ; Vigneswara V. *et al.,* 2012 ; Miles M.A. *et al.,* 2017). Ce siRNA cause diminue de 65 à 80 % l'expression des ARNm de CASP-2 chez l'homme. Ce composé, nommé QPI-I007 est en essai clinique de phase 3 pour le NIAON (Non Arteritic Ischemic Optic Neuropathy) et de phase 2 pour le glaucome avec une application pour les glaucomes (Titze-de-Almeida R. *et al.,* 2017).

Enfin, sur des modèles de lésions oculaires chez le rat, Thomas C.N. et al., ont pu démontrer que la CASP-2 est impliquée dans la mort des RCGs, cette action est localisée puisqu'elle ne permet pas de protéger les photorécepteurs de la mort dans ce modèle. Ainsi, l'administration en intra vitréenne de siRNA ciblant CASP-2 pourrait constituer un réel atout thérapeutique pour les lésions du nerf optique faisant suite à un traumatisme (Thomas C.N. et al., 2018).

8. Régulation de l'activité Caspase-2

La difficulté à détecter l'activation de CASP-2 semble indiquer qu'elle est soumise à un contrôle très fin. En effet, en absence de stress cellulaire, son activation semble être restreinte par de nombreux mécanismes.

8.1. Régulation de l'expression du gène CASP-2

Le niveau d'expression ainsi que le ratio des isoformes de CASP-2 sont sous le contrôle de nombreux facteurs. Par exemple, la transcription de *Casp-2* est réprimée par le *Brain Derived Neurotrophic Factor*. Dans une variété de lignées cellulaires, l'expression de la CASP-2 est induite par la fixation d'agents hypocholestérolémiants dont le but est de diminuer les taux de cholestérol sanguin. Ces derniers viennent se fixer sur des séquences régulatrices, SREBP (*Sterol regulatory element-binding proteins*) localisées dans la région 5' non codante (Logette E. *et al.*, 2005). L'inclusion de l'exon 9, en faveur de l'expression de CASP-2_s survient surtout au cours de la phase S du cycle cellulaire et peut être déclenchée par un traitement avec de l'étoposide, un inhibiteur des topoisomérases. De manière intéressante, le premier exon 1 classiquement identifié dans l'ARNm codant CASP-2_L est présent dans la séquence de l'ARNm codant CASP-2_s qui est généré suite à un traitement à l'étoposide. Cette observation indique que l'épissage des exons 1 et 9 peuvent être contrôlé séparément. Le facteur *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*, hnRNP A1 classiquement impliqué dans le l'épissage du pré-ARNm ainsi que le transport et le métabolisme des ARNm, stimule la conservation de l'exon 9 en faveur de la synthèse de l'isoforme court. La PKC-ξ induit la même

réponse, certainement en phosphorylant hnRNP A1. RBM5, une protéine potentiellement suppresseur de tumeur pourrait se fixer sur une séquence riche en U/C en amont d'In100 et agir de concert avec cette dernière pour stimuler l'épissage entre les exons 8 et 10, pour stimuler l'expression de CASP-2_L (Fushimi K. *et al.*, 2008). Enfin, l'expression de l'ARNm de CASP-2L semble dominer l'expression de l'ARNm codant CASP-2_s, conséquence d'un promoteur plus fort pour l'expression de CASP-2_L (Logette E et al., 2003).

En 2008, Baptiste-Okoh N. *et al.*, ont démontré que l'expression de CASP-2 est négativement régulée par p53 en absence ou en présence de dommage à l'ADN. P53 est un suppresseur de tumeur, régulateur crucial de destin cellulaire. En fonction du contexte cellulaire, p53 déclenche une variété de réponses antiprolifératives. Pour cela il fonctionne comme un activateur transcriptionnel qui agit grâce à un domaine de trans-activation bipartite (TAD) qui consiste en TAD I et TAD II. La répression de CASP-2 se fait par le biais de deux interactions, l'une directe avec domaine de trans-activation de p53 et une autre indirecte par p53 au travers du *cyclin-dependent kinase inhibitor* p21, un inhibiteur du cycle cellulaire. Audelà d'une certaine concentration, p21 induit l'hypophosphorylation de Rb, (retinoblastoma protein) qui va convertir le facteur de transcription E2F-1 en répresseur qui va empêcher l'expression de CASP-2 (Bartek J. *et al.*, 2001). Cette répression du taux de CASP-2 par p53 pourrait participer à la détermination du devenir de la cellule en prévenant de la mort cellulaire lorsque ce n'est pas nécessaire.

8.2. Régulation post-traductionnelles

La phosphorylation est l'un des mécanismes régissant la régulation de l'activation de CASP-2. En effet, comme il a pu être montré dans les lignées cellulaires cancéreuses, la protéine Kinase CK2 (PKCK2) peut phosphoryler pc-2 au niveau de la Ser-157 pour prévenir de son activation par dimérisation.

Dans les ovocytes de Xénope il a été montré que la phosphorylation de pc-2 au niveau de son pro-domaine au site Ser-135 par la *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) est sous contrôle métabolique. En effet, un niveau élevé de NADH, issu de la voie des pentose phosphate, active la kinase qui va alors phosphoryler pc-2 entraînant l'arrivée d'une *phosphoserine/phosphothreonine binding protein*, 14-3-3 pour prévenir d'une déphosphorylation. Cette phosphorylation prévient de l'activation de la protéase en empêchant l'interaction de CASP-2 avec RAIDD *via* son domaine CARD. En absence de

nutriments, 14-3-3 se détache de CASP-2 qui peut alors être déphosphorylée par la protéine phosphatase 1 (PP1). Pour expliquer le contrôle de l'activité CASP-2 par 14-3-3 des études structurales ont été menées. Un mode d'action a pu être proposé sur la base de ces études. La CASP-2 phosphorylée pourrait former un complexe avec 14-3-3 dans lequel les domaines p19 et p12 du monomère de CASP-2 sont positionnés dans à l'interface du dimère que forme 14-3-3. À ce niveau les extrémités terminales de chaque protomère de 14-3-3 viennent stabiliser le complexe, empêchant ainsi l'activation de CASP-2. De plus, il semble également que 14-3-3 puisse réguler l'activation de la CASP-2 en masquant la séquence de localisation nucléaire. Plus précisément, la NLS de la pc-2 est enfouis à l'interface de dimérisation de 14-3-3, contenue au fond du canal que forme cette interface et la petite sous-unité p12 du monomère de la pro-Caspase (Smidova A. et al., 2018).

Un autre site de phosphorylation se trouve au niveau de Ser-340, dans la région linker entre la grande et la petite sous-unité. La phosphorylation à ce site par le complexe cdk1cyclineB1 empêche l'activation de la CASP-2 au cours du cycle cellulaire et empêcher ainsi une catastrophe mitotique.

Enfin, des expériences de surexpression laissent penser que la CASP-2 pourrait être SUMOylée au niveau de son domaine CARD sur la Lys-60, cependant l'importance de cette modification pour l'activation où la localisation de CASP-2 n'est pas encore très claire (Kitevska T. *et al.,* 2009).

8.3. Régulation de la formation du PIDDosome par BubR1

Des études biochimiques ont révélé que l'interaction PIDD-RAIDD plutôt que l'interaction RAIDD-CASP-2 était limitante pour l'assemblage du PIDDosome. En plus d'initier le recrutement de RAIDD par libération de PIDD-CC, les lésions de l'ADN entraîne également la limitation de l'activité du PIDDosome. Ce contrôle est exercé en partie par la signalisation de la Checkpoint kinase 1 (Chk1). Thompson R. *et al.*, en 2016 ont mis en évidence que BubR1 (*Budding uninhibited by benzyimidazole-related 1*), une Ser/Thr Kinase qui est sert de point de contrôle mitotique, constituait également un inhibiteur du PIDDosome en réponse à des dommages à l'IDN induit par des rayonnements ionisants lors de la mise en place du fuseau mitotique. Dans la cellule, BubR1 est un composant du Complexe de Checkpoint Mitotique ou MCC. Le MCC est composé de Mad-2, Bub3-Cdc20 et BUbR1 et forme un tétramère qui retarde l'anaphase en inhibant l'*Anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C) en réponse à une

dysfonctionnement de l'attachement des microtubules au niveau du kinétochore (KT). Cette structure constitue un assemblage de protéines au niveau des régions centromériques des chromosomes mitotiques. Dans son rôle d'inhibiteur du PIDDosome, BubR1 agit au niveau du KT mais indépendamment du complexe MCC. En termes de mécanisme d'action, suite à des dommages par radiation au niveau de l'ADN, BubR1 est recruté pour former le MCC (voie canonique) mais il entre également en compétition avec RAIDD pour la fixation au niveau des DDs de PIDD-CC, permettant ainsi de prévenir l'assemblage du PIDDosome et par conséquent l'induction de l'apoptose jusqu'à l'achèvement de la mitose (**Figure 36**).

Le PIDDosome constitue un nouveau point de contrôle mitotique pour déterminer le destin de la cellule qui entre en division. Lors de lésions de l'ADN, ATM phosphoryle PIDD à proximité du site de lésion au cours de l'interphase, à ce niveau Chk1 pourrait relayer le signal de dommage à l'ADN à BubR1 bien que BubR1 seul soit suffisant pour l'inhibition de la formation du PIDDosome. Par conséquent BubR1 se lie à PIDD au cours de la prophase et le complexe se dirige ensuite au niveau du KT à l'aide d'autres protéines telles qu'Aurora B et Bub1. Ce recrutement au KT est indispensable pour l'inhibition totale de la formation du PIDDosome. En effet, bien que l'interaction de PIDD:BubR1 soit nécessaire elle est néanmoins insuffisante pour l'inhibition du PIDDosome. À niveau du KT, les protéines agissent en stabilisant l'interaction entre PIDD et BubR1 d'une part et empêchent la fixation de RAIDD au niveau du complexe PIDD:BubR1, d'autre part. De plus, le complexe de contrôle mitotique Cyclin-dependent kinase 1 ou Cdk1/CyclineB1 au cours de la mitose, peut phosphoryler pc-2 au niveau de la Ser-340, qui est localisée dans la région *linker* qui sépare la grande et la petite sous-unité et ce, jusqu'au passage du point de contrôle par la cellule. Ainsi, les points de contrôle mitotiques agissent à deux niveaux pour contrôler l'assemblage du PIDDosome. D'une part, en amont de l'anaphase, régit par APC/C, et en réponse à des lésions à l'ADN, BubR1 agit en compétiteur de RAIDD pour la fixation à PIDD au niveau du KT. D'autre part, en aval de APC/C en prévenant du recrutement de la CASP-2 au niveau du PIDDosome ou en empêchant l'activation de l'enzyme (Shah R.B. et al., 2016).



Figure 36. Connexion entre la machinerie de checkpoint mitotique et l'activation du PIDDosome.

En présence de BubR1, BubR1 est mobilisé à deux niveaux, d'une part au niveau du complexe MCC (fonction canonique) et au niveau de PIDD. Bubr1 permet donc de prévenir l'activation des caspases initiatrices et notamment de la CASP-2 en permettant la phosphorylation des Caspases par cdk1/cyclineB1 suite à l'inhibition du complexe APC/C. Suite à des lésions de l'ADN BubR1 peut entrer en compétition avec RAIDD pour la liaison à PIDD au niveau du kinétochore, afin d'éviter l'activation du PIDDosome et par conséquent empêcher l'activation de CASP2. La voie Cdk1 est constitutive dans la cellule tandis que la voie d'inhibition de PIDD n'est enclenchée que suite à des dommages à l'ADN. En absence de BubR1, suite à un stress génotoxique par exemple, les zymogènes de Caspases ne sont plus inhibés et peuvent être activées au sein de leurs plateformes d'activation. MCC : Complexe de Checkpoint Mitotique ; Cdk1 : *cyclin-dependent kinase 1*; APC/C : *Anaphase-promoting complex/cyclosome* ; BubR1 : Budding uninhibited by benzyimidazole-related 1 ; RAIDD : *RIP-associated Ich-1/CED homologous protein with Death Domain*) ; PIDD1 : *p53-induced protein with a death domain 1* ; KT : kinétochore. D'après Shah R.B. *et al.*, 2016 et Thompson *et al.*, en 2016.

8.3.1. Inhibiteurs naturels de Caspase-2

Les CASP-3, -7 et -9 sont la cible des inhibiteurs de la famille des IAPs. En revanche, in vitro l'activité de CASP-2 vis-à-vis de son substrat z-VDVAD-7-Amino-4trifluoromethylcoumarin (AFC) n'est pas impactée par la présence de XIAP ainsi que par la présence des domaines BIRs exprimés de manière individuelle. De plus cIAP-1 et -2 semblent également incapables d'inhiber la CASP-2. Cependant, comme la majorité des membres de cette famille, CASP-2 est inhibée par les protéines de baculovirus p35 et p49, tandis que l'inhibiteur CrmA est inefficace vis-à-vis de CASP-2 (Ho P-k. et al., 2005 ; Kitevska T. et al., 2009).

Un stress lié à la température induit l'apoptose mais active également le facteur de protection HSF-1 (*Heat shock factor 1*). Il s'agit d'un facteur de transcription qui induit l'expression d'un grand nombre de *heath shock* proteins et dont Hsp-90 α . HSF-1 semble empêcher l'activation de CASP-2 après un choc de température par le biais de Hsp-90 α . Cette dernière agit en augmentation le seuil d'activation de CASP-2 au cours de l'apoptose induite par un choc de température (Bouchier-Hayes L. 2010).

IV.La Caspase-2 dans le système nerveux central

Au cours du développement embryonnaire, *NEDD-2* est fortement exprimée au niveau du système nerveux central, une zone associée à une mort cellulaire massive. Dans les tissus adultes, les ARNm de NEDD-2 sont présents au niveau du cerveau également, dans la majorité des neurones avec des taux d'expression variable. Les ARNm sont présents au niveau du cortex, du pont, des noyaux rouges ainsi que dans les cellules granulaires et de Purkinje du cervelet (Kumar S. *et al.*, 1994).

C'est en 2011, grâce à des outils génétiques (souris KO Casp-2 et siRNA) qu'on pu être mis en évidence les premiers rôles physiopathologiques de la CASP-2.

A. Rôle de la Caspase-2 dans des modèles de stress neuronaux

1. Hypoxie / ischémie néonatale

Les lésions périnatales peuvent considérablement impacter le quotidien des individus, avec notamment des paralysies cérébrales, des déficits cognitifs, un retard mental ou des épilepsies. Parmi toutes les lésions cérébrales, l'ischémie périnatale et la prématurité sont des causes importantes de handicap. Les ischémies cérébrales dans le cerveau en développement impliquent différents facteurs, tels que l'excitotoxicité, le stress oxydant, et l'inflammation. De nombreuses études suggèrent un rôle plus important de l'apoptose dans les ischémies néonatales en comparaison aux formes d'ischémies cérébrales chez l'adulte (Johnston M.V. et al., 2002).

En 2011 Carlsson Y. *et al.*, ont montré qu'une ligature de l'artère carotide interne chez des souris KO CASP-2 de 9 jours, soumises à une hypoxie (10 % d'oxygène) pendant 50 min présentaient, 7 jours après la lésion, un volume d'infarction 32% plus petit que les souris non mutantes. Ces observations laissent à penser que l'inhibition génétique de CASP-2 est neuroprotectrice chez des souris nouveau-nés, soumis à une hypoxie/ischémie. Contrairement à l'étude de Bergeron L. *et al.*, en 1998, qui n'avait pas permis d'identifier de différences dans les volumes d'infarction entre les animaux adultes KO CASP-2 et WT après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant 24h ou 2h, suivi d'une reperfusion pendant 18h. La différence entre ces études peut être expliquée par le fait que l'expression de la CASP-2 est élevée chez les souris nouveau-nés ainsi que dans les cerveaux de rat et décroit à partir de la deuxième semaine de vie.

2. Caspase-2 et Excitotoxicité

Le cerveau en développement est particulièrement sensible à l'excitotoxicité, une composante clé dans la réponse à l'ischémie cérébrale. Lors du stress ischemique, la dépolarisation neuronale est importante et entraîne une libération massive d'acides aminés excitotoxiques et plus particulièrement de glutamate. Ce dernier entraîne alors une stimulation excessive des récepteurs au glutamate et notamment des NMDARs qui favorisent l'entrée de calcium dans la cellule, entraînant alors la neurotoxicité. Afin d'étudier le rôle de la CASP-2 dans l'excitotoxicité, Carlsson Y. *et al* ont injecté de l'ibotenate, en intracérébral, à des souris nouveau-nés (5 jours) WT et KO-CASP-2. L'ibotenate est un puissant agoniste glutamatergique qui se fixe essentiellement aux NMDARs et aux récepteurs métabotropiques du groupe I (mGluR1 et mGluR5) et II (mGluR2 et mGluR3). Ce traitement produit des lésions excitotoxiques, kystiques corticales et de la matière blanche chez les souris WT (**Figures 37 B**). En revanche les lésions corticales et de la matière blanche sont respectivement 41% et 59% plus petites chez les animaux constitutivement déficients pour CASP-2 (**Figure 37 A**). Par conséquent l'inhibition génétique de la CASP-2 dans ces modèles d'excitotoxicité confère une forte neuroprotection contre ce type de lésion.



Figure 37. L'inhibition génétique de CASP-2 réduit les lésions suite à une ischémie dans le cerveau de souris nouveau-nés.

(A) Souris C56BL6, KO CASP-2 et WT de 9 jours soumises à une occlusion unilatérale de la carotide et exposées à % pendant 5Ò 10 O₂ min L'histogramme rapporte la quantification des volumes d'infarction suite à un marquage MAP2 sur des. coupes de cerveau des animaux KO CASP-2 WΤ et niveau au de l'hippocampe (B) La coloration au violet de crésyl révèle l'effet de l'iboténate sur des cerveaux murins WT (gauche) et Casp2^{-/-} (droite).Le cerveau de l'animal WT injecté avec l'iboténate montre une perte neuronale (flèche) ainsi qu'une lésion kystique dans la substance blanche (*). Tandis que le cerveau de la souris KO Casp-2 montre une réduction de la perte neuronale (flèche) ainsi qu'une absence de lésion kystique dans la substance blanche. Échelle : 50 µm. D'après Carlsson Y. et al., 2011

3. Carence en sérum ou en facteurs de croissance neuronaux

Au cours du développement aussi bien qu'en condition pathologiques, les neurones qui ne parviennent pas à trouver leurs cibles ou des facteurs neurotrophiques dégénèrent.

Les axones des neurones du ganglion spinal (DRNG en anglais) transmettent l'information sensorielle de la périphérie au SNC. *In vivo*, suite à une axotomie du nerf sciatique, la CASP-2 est responsable de la mort par apoptose des DRNGs et des cellules satellites qui constituent un support trophique. De plus, *in vitro*, l'inhibition de l'expression de CASP-2 par siRNA protège les DRGN axotomisés de l'apoptose induite par une déplétion en facteurs neurotrophiques (Vigneswara V. *et al.*, 2013).

Les lignées PC12 sont dérivées de pheochromocytoma et sont des bons modèles pour l'étude de la différenciation neuronale et de la neurosécrétion. Ces cellules ainsi que les neurones sympathiques de souris et de rat semblent impliquer la CASP-2 pour l'initiation de l'apoptose en réponse à une carence en facteur trophiques. La répression conditionnelle par siRNA et la répression chronique par transfection protègent les PC12 de la mort induite par une carence en facteurs trophiques (Troy C.M. et al., 1997). En revanche, contrairement aux neurones provenant de souris WT, les neurones sympathiques issus de souris KO CASP-2 restent sensibles à la carence en facteurs trophique et meurent (Jean Y.Y. et al., 2013). De plus, l'expression de CASP-9 au niveau ARNm et protéique est augmentée de 3 fois dans les cerveaux de nouveau-nés CASP-2^{-/-} et de 5 fois dans les cultures de neurones sympathiques (Troy et al., 2000). D'ailleurs l'expression de Smac/DIABLO est également élevée. Ces observations suggèrent donc que l'activité CASP-9 compense la perte de la CASP-2 en activant la voie mitochondriale en réponse à la carence en facteurs trophiques. Ces informations suggèrent que les neurones sympathiques WT possèdent deux voies alternatives impliquant la CASP-2 ou -9 pour induire la mort suite à une carence en facteurs trophiques. Dance ce processus, la voie CASP-2 semble être majoritaire avec une activité proximale de cette enzyme associée à un contrôle de l'activité de CASP-9 par les IAPs, puisque les cultures de neurones sympathiques WT avec une inhibition de l'expression de CASP-2 par siRNA sont résistantes à la mort induite par la carence en facteur de croissance neuronaux (Troy C.M. et al., 2001).

Dans des modèles *in vitro* de mort neuronale aigues par carence en facteurs trophiques, la CASP-2 agit en initiatrice de l'apoptose en amont de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale dans des neurones corticaux primaires. Dans ce contexte cellulaire, la CASP-2 contrôle le clivage de BAX et sa relocalisation à la mitochondrie pour induire la PMEM

et l'activation de l'Apoptosome. À l'aide d'outils génétiques et pharmacologiques, Chauvier *et al.,* en 2005, ont pu démontrer une mise en place séquentielle de l'apoptose où la CASP-2 cytosolique est activée très précocement dans le processus de mort et induit l'activation de BAX, qui est transloqué à la membrane externe mitochondriale et précède à une chute de potentiel transmembranaire de la membrane interne avant le relargage de cytochrome *c* et la formation de l'Apoptosome qui permet l'activation de CASP-9 puis de CASP-3 (**Figure 38**).

4. Mitochondrie, stress oxydant et Caspase-2

Des dysfonctions mitochondriales dues à des mutations ou une exposition à des agents toxiques, déclenchent une diminution de la synthèse de l'ATP et une augmentation de la production d'ERO qui peuvent entraîner une mort de la cellule. Le traitement de neurones primaires corticaux avec de la roténone est un bon modèle d'étude pour l'étude de la mort neuronale qui implique des dysfonctions de la mitochondrie. La roténone est une neurotoxine qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire et qui cause une chute de la synthèse d'ATP et une accumulation de radicaux entraînant un stress oxydant qui peut mener à la mort. Dans ce modèle, Tiwari M. et al., en 2011, ont montré que la CASP-2 agit en médiateur proximal de l'apoptose induite par la roténone sur des cultures de neurones corticaux primaires. Une fois activée la CSAP-2 entraîne la PMEM par activation de BAK pour achever l'apoptose par la voie intrinsèque. Le rôle initiateur de la CASP-2 dans cette voie est appuyé par le fait que CASP-2 induit l'activation des CASP-3 et -9 et que sa délétion prévient totalement de la mort cellulaire en comparaison à l'inhibition des autres Caspases. Dans ce modèle, il s'avère que la CASP-2 est activée par les ERO produits par les dommages mitochondriaux. Parmi les Caspases, CASP-2 possède le nombre maximal de cystéines et compte tenu de la réactivité des cystéines, cela justifie qu'elle puisse être activée par l'anion superoxyde par exemple (Figure 38).

Contrairement aux neurones sympathiques CASP-2^{-/-}, l'absence de CASP-2 dans les neurones corticaux ne semblent pas être composée par d'autres Caspases. Cependant, après une stimulation de ces neurones à la roténone l'autophagie prend le relai en réponse au stress oxydant induits par les dommages à la mitochondrie. Par conséquent, dans ce modèle, les neurones CASP-2^{-/-} traités avec de la roténone qui ne peuvent pas entrer en apoptose induisent l'autophagie pour lutter contre le stress oxydant en éliminant les organites et les macromolécules endommagées. Finalement, si l'autophagie ne suffit pas les neurones meurent par nécrose (**Figure 38**).



Figure 38. Modèle proposé pour l'activation de la CASP-2 dans des modèles de stress neuronaux sur des cultures corticales primaires.

La roténone et la carence en facteurs neurotrophiques l'apoptose induisent par activation proximale de la CASP-2, en amont de la perméabilisation membrane la externe de mitochondriale. Dans le modèle roténone, lorsque la CASP-2 est absente, l'autophagie prend le relai pour essayer de sauver la cellule, si la réparation échoue, les neurones meurent par nécrose.

B. La Caspase-2, une des cibles de la maladie d'Alzheimer?

1. Axe β -amyloïde

1.1. Caspase-2 : Médiateur de la synpatotoxicité induite par $A\beta$?

1.1.1. Généralités sur la dynamique de la synapse

Les épines dendritiques sont de petites protrusions (<2 µm) qui se forment sur les dendrites de la plupart des neurones du systèmes nerveux central et sont des sites majeurs pour la formation de synapses excitatrices. Morphologiquement, elles sont formées d'une tête en forme de bulbe ou de champignon avec un cou fin (**Figure 39 A**). Chez les jeunes neurones les dendrites sont couvertes de longues et fines protrusion appelées filopodia qui sont les précurseurs des épines dendritiques (Tashiro A. *et al.*, 2004). La transmission synaptique et la plasticité neuronale reposent sur les épines dendritiques, cette structure post-synaptique réceptive de la synapse. La dynamique de la synapse et les fonctions synaptiques sont étroitement liées puisqu'en réponse à un stimulus extracellulaire, le volume et la surface de l'épine change afin de réguler l'efficacité synaptique. Par exemple, le volume de l'épine augmente en LTP et décroit en LTD, des modifications qui sont par conséquent les bases de l'apprentissage et de la mémoire. Ces changements morphologiques sont relayés par une dynamique du cytosquelette riche en actine F présent au niveau des épines ainsi que par les voies de signalisation intracellulaires associées. Les Rho GTPase ont un rôle clé dans ce processus puisqu'elle connectent les signaux des récepteurs *post-synaptiques aux partenaires*

protéiques qui se lient à l'actine F pour permettre le remodelage du cytosquelette et par conséquent de l'épine dendritique (forme et densité) (**Figure 39 B**). Cette famille de protéines inclue Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), Cdc42 (*cell division control protein 42*) et RhoA (Ras homologous member A). Elles agissent en interrupteur moléculaires oscillant entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Trois types de protéines sont impliquées dans les échanges GTP/GDP ; les GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) qui catalysent l'échange GDP->GTP, les GAPs (*GTPase-activating proteins*) qui catalyse la réaction opposée pour inactiver les Rho GTPase et GDIs (*guanosine nucleotide dissociation inhibitors*) qui maintiennent les GTPases dans leur états inactifs en les séquestrant dans le cystoplasme.

Rac1 et RhoA contrôlent la morphologie de la synapse. En effet, l'activation de Rac1 et Cdc42 conduisent à la formation de l'épine tandis que la forme active de RhoA participe au *pruning* en entraînant une diminution de la densité de l'épine, antagonisant ainsi les effets de Rac1. Lors de la stimulation des NMDARs, RhoA liée au GTP s'associe à ROCK (*Rho-associated protein kinase*) pour entraîner la déstabilisation du cytosquelette d'actine au niveau de la membrane *post-*synaptique (PSD) (Bolognin S. *et al.,* 2014). D'ailleurs PSD-95 est une protéine abondante de PSD qui forme une double couche en-dessous de la membrane de la synapse et pour permettre par exemple l'ancrage des NMDARs au niveau de PSD.


Figure 39. Régulation de la morphologie de la synapse par la signalisation Rho GTPase,

Reconstruction 3D de prolongements (A) dendritiques avec agrandissement sur les épines. (B) représentation schématique de l'organisation structurale d'une épine dendritique. GEFs et GAP sont connectés aux récepteurs via les protéines d'échafaudages (PSD-95, molécules d'adhérences, ...) de la membrane *post*-synaptique (PSD) afin de connecter les Rho GTPase aux signaux cellulaires extérieurs. La voie de signalisation initiée par les Rho GTPase cible les protéines de liaison à l'actine F pour le remodelage du cytosquelette. De nombreuses protéines interviennent dans ce remodelage, ici, seules Arp2/3 (ronds bleus) et cofiline (triangle vert) sont représentées. D'après Bolognin S. et al., 2014

1.1.2. Caspase-2 et modulation de la synapse en réponse à $A\beta$

La dysfonction et la perte synaptique sont des événements précoces dans la maladie d'Alzheimer. De nombreuses Caspases sont activées chez les patients AD ainsi que dans les modèles animaux, dont CASP-1, -2, -3, -6 et -9. Ces observations suggèrent que les Caspases pourraient aussi avoir un rôle non apoptotique dans la maladie d'Alzheimer, par exemple en participant à ces changements synaptiques.

Dans des cultures primaires d'hippocampes traitées avec de l'A β et dans des souris J20hAPP, Pozueta J. *et al.*, en 2013, ont démontré que CASP-2 est un régulateur clé de la régulation de la densité et de la morphologie de l'épine dendritique en réponse à A β . En effet, la répression de cette enzyme prévient des changements morphologiques de l'épine dendritiques induits par A β . Plus précisément, le croisement des souris J20 avec des souris KO CASP-2 prévient des phénotypes classiquement observés chez les souris J20 à savoir : (i) déficits de la mémoire ; (ii) changements de morphologie des épines dendritiques chez les jeunes sujets (4 mois). (iii) perte des épines dendritiques chez les souris plus âgées (14 mois) (**Figures 40A et B**). Le point intéressant est que ces effets de la délétion de la CASP-2 se font indépendamment d'une réduction des niveaux d'A β puisque les taux d'A β solubles et de plaques amyloïdes ne varient pas par rapport aux animaux J20.

Dans ce processus de modulation de la synapse, CASP-2 pourrait jouer un rôle clé dans l'activation de la signalisation de la RhoA-GTPase en réponse à l'A β .

Tout d'abord, A β induit le recrutement de RhoA et ROCKII (colocalisation avec PDS-95) au niveau de l'épine dendritique sur des cultures primaires hippocampiques. Ensuite, A β permet également la translocation de CASP-2 au niveau de l'épine dendritique. Enfin, en absence de CASP-2 la translocation de RhoA à l'épine est diminuée (colocalisation avec PSD95 diminuée), ce qui signifie que CASP-2 pourrait faciliter la translocation de RhoA au niveau de l'épine après traitement A β . Par conséquent, CASP-2 et RhoA-GDP pourraient former un complexe hors de l'épine en condition physiologique. Un contrôle supplémentaire exercé par GDI permettrait d'empêcher l'interaction de RhoA-GDP avec une GEF. En condition pathologique, en présence d'A β notamment, CASP-2 et RhoA s'activeraient conduisant à une dissociation du complexe. Dans leurs formes actives CASP-2 et RhoA-GTP sont délocalisées au niveau de l'épine et peuvent interagir avec ROCKII pour entraîner la rétractation de l'épine.

Ces éléments suggèrent que CASP-2 pourrait contrôler la localisation et peut être la signalisation RhoA/ROCK II pour participer à la modulation des changements synaptiques et à l'altération de la mémoire induits par A β .



Figure 40. La perte synaptique et les changements de morphologie de l'épine dendritiques observés chez les souris J20 est réversés dans les animaux J20/KO CASP-2.

(A) mois, l'analyse morphologique des épines révèlent une diminution des populations avec un bulbe bien net chez les J20 contrairement aux WT et J20/KO CASP-2. À 14 mois, la densité chez les animaux J20 est réduite d'environ 50% par rapport aux animaux WT tandis que les animaux J20/KO CASP-2 ne présentent pas d'altération de la densité. (B) Quantification de la perte synaptique chez les différents animaux en fonction de l'âge. Pozueta J. et al., en 2013

1.2. Médiateur de la toxicité induite par Aβ

Dans la maladie d'Alzheimer le peptide amyloïde et un défaut dans l'apport en facteurs trophiques sont impliqués dans les processus neurodégénératifs caractéristiques de cette pathologie. Aussi, en plus de participer à l'effet synaptotoxique induit par le peptide A β à des stades précoces de la pathologie, la CASP-2 est également un médiateur de la neurotoxicité

induite par A β dans les neurones. En effet, CASP-2 est requise pour l'effet apoptotique d'A β dans des cultures primaires d'hippocampes. De plus, les neurones hippocampiques de souris CASP-2^{-/-} sont résistants à la mort induite par l'exposition à des oligomères l'A β_{1-42} in vivo. Dans de nombreux paradigmes de mort neuronale, les stimuli apoptotiques initient différentes voies de signalisation qui convergent vers l'activation du facteur de transcription c-jun pour stimuler l'expression de BIM, une protéine pro-apoptotique qui agit généralement en amont de la cascade des Caspases (Putcha G.U. et al., 2001). Une étude menée par Jean Y.Y. et al., en 2013 place la CASP-2 en amont de la transcription de BIM, puisque dans les cultures de neurones hippocampiques, CASP-2 est activée 30 min après induction du stress dans les neurones, et ceci bien avant l'apparition des premiers signes de la neurodégénérescence et avant l'induction de l'expression de BIM au niveau ARNm ou protéique. Ces différents éléments placent donc la CASP-2 très en amont dans le processus de mort neuronale suite au traitement avec des oligomères d'A β_{1-42} . D'ailleurs, in vivo, l'injection d'Aβ₁₋₄₂ oligomérique dans l'hippocampe induit une augmentation de l'expression de CASP-2 et de BIM dans les mêmes neurones, et la co-expression de CASP-2 et BIM a pu également être mise en évidence dans les neurones du cortex entorhinal chez des patients AD (Jean Y.Y. *et al.,* en 2013).

Dans ce processus de mort neuronale, CASP-2 favoriserait la phosphorylation activatrice de c-jun par JNK. Pour cela, elle pourrait cliver soit de manière à activer un initiateur de la voie, soit en levant la répression d'un inhibiteur de la voie, par exemple PKC δ ou FoxO3. Une fois activé c-jun est transloqué au niveau du noyau pour induire l'expression de BIM. Ce dernier qui peut alors entraîner la mort du neurone en activant BAX pour favoriser le relargage de cytochrome *c* et par conséquent permettre l'activation des CASP-9 et -3. (Troy C.M. *et al.,* 2000 ; Ribe E.M. *et al.,* 2012).

2. Caspase-2 et Tau

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une phosphorylation anormale et une agrégation de Tau qui conduisent à la formation de paires de filaments hélicoïdaux qui forment des enchevêtrements de neurofibrilles caractéristiques dans le neurone. Une possibilité qui explique l'effet néfaste de Tau sur le neurone est la production de produits de clivage toxiques. En effet, jusqu'à récemment, l'intérêt s'était porté sur le produit de clivage de Tau au niveau de l'Asp-421, par CASP-3 et -7 identifié chez les patients AD. En 2016, les

travaux de Zhao X. *et al.*, ont mis en évidence un nouveau produit de clivage de 35 kDa, TCP35. Ce dernier est formé suite au clivage de Tau après l'Asp-314 par CASP-2 et permet la libération d'un fragment N-terminal, Δ Tau314. Il semblerait que ce fragment Δ Tau314 soit abondant dans le cerveau des souris rTg4510, ainsi que dans les cerveaux de patients AD. Dans leur étude, Zhao X. *et al* ont montré que Δ Tau314 résiste à la fibrillation et entraîne une translocation anormale de la protéine Tau entière, Tau^{P310L}, au niveau de l'épine dendritique (**Figure 41**). Dans des modèles *in vitro* de taupathies et chez les jeunes souris rTg4510 (2-3 mois) ils ont montré que la présence de Tau^{P310L} au niveau de l'épine entraînerait une détérioration des fonctions synaptiques et cognitives. Ces dommages sont la conséquence d'une réduction de l'ancrage des AMPARs au niveau de la membrane *post*-synaptique. Finalement, l'expression de Tau mutée au niveau de l'Asp-314, Tau^{P310L/D314E}, prévient l'infiltration de Tau au niveau de l'épine dendritique, mais aussi des altérations cognitives et synaptiques. De plus, l'expression de ce Tau mutant chez les souris Tg4510, protège des déficits de mémoire et de la neurodégénérescence.



Figure 41. CASP-2 dive Tau, pour libérer un fragment Nter ∆Tau314 et C-ter TCP35 La CASP-2 clive Tau au niveau de l'Asp-314. La libération de∆Tau314 favorise la translocation de Tau entière au niveau de l'épine dendritique. Cette présence anormale de Tau dans cette zone entraîne des altérations synaptiques et cognitives qui résulte d'une perturbation de la signalisation des récepteurs AMPA. (Troy C.M. et al., 2016)

3. Enjeux

Compte tenu de tous ces éléments, la CASP-2 pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, CASP-2 est un médiateur clé de la synaptotoxicité dans les cultures primaires et chez les animaux. Et, puisque son expression est élevée dans les cerveaux des patients AD et qu'elle est indétectable dans les cerveaux sains, il serait possible qu'une inhibition sélective de cette enzyme, particulièrement à des étapes précoces de la pathologie puisse améliorer les altérations synaptiques et les déficits de la mémoire. De plus, elle est aussi un médiateur proximal de la neurotoxicité induite par le peptide amyloïde. Plus récemment, dans l'étude du clivage de Tau au niveau de l'Asp-314, il

semblerait qu'elle joue à ce niveau aussi, un rôle dans les altérations de la synapse et les déficits cognitifs. La solution serait donc de cibler sélectivement cette enzyme avec un inhibiteur pharmacologique.

C. Stratégies thérapeutiques actuelles pour la maladie d'Alzheimer

Actuellement, quatre molécules sont utilisées en clinique : le Donepezil (Aricept), la galantamine (Reminyl), Rivastigmine (Exelon) et la Mémantine (Noojerone). Les trois premières molécules sont des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (AChE), tandis que la mémantine est un antagoniste non compétitif des récepteurs au NMDA. Au départ les inhibiteurs de première génération, comme la tacrine, ciblaient les AChE mais présentaient le gros défaut d'être peu sélectifs *vis-à-vis* des cibles et des organes cibles. La seconde génération de molécules qui inclue l'Aricept (approuvé depuis 1996) et la galantamine (2001) présentent une bonne sélectivité envers les AChE. Une autre approche dans la stratégie médicamenteuse anti-AD a été réalisé par Novartis avec le développement de la Rivastigmine, approuvée depuis 1998. Cette molécule régiosélective, inhibe sélectivement les AChE du cerveau plutôt que les autres isoformes périphériques. Ces trois molécules ont des effets favorables sur les symptômes à des stades précoces et modérés de la pathologie. Enfin la mémantine a été introduite sur le marché en 2003, pour le traitement des formes modérées à sévère de la maladie (**Figure 42 B**).

Aujourd'hui, 112 molécules sont actuellement en essai clinique pour le traitement de la maladie d'Alzhieimer soit 26 agents dans 35 essais en phase III,63 molécules dans 75 essais en phase II et 23 composés dans 25 essais en phase I (Cummings J. et al., 2018). En fonction de leurs cibles, les molécules peuvent être divisées en plusieurs groupes comme représenté en **Figure 42 A**.



Figure 42. Stratégie thérapeutiques actuelles pour le développement de médicaments. (A) Molécules en essai clinique en Juin 2016 pour la maladie d'Alzheimer. Distribution des molécules en fonction de leur mode d'action. Puisque certains composés ont plusieurs cibles, ils sont retrouvés dans plusieurs groupes. (B) Molécules sur le marché pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. (C) Molécules en essai clinique ciblant la formation d'Aβ. (D) Molécules en essai qui affectents l'agrégation de Tau (Bachurin S.O. *et al.*, 2017).

1. Cibler $A\beta$ sous toutes ses formes

Une des approches la plus attractive est le développement de molécules capables de déstabiliser, d'éliminer ou d'empêcher la formation des agrégats d'Aβ. Cette catégorie de molécules est subdivisée en sous-groupe en fonction du processus ciblé. L'hypothèse initiale du déploiement du système immunitaire s'est avérée intéressante et un nombre important de vaccins anti-amyloïdes ont été développés. Actuellement neuf vaccins sont en phase I.

L'une des approches la plus employée dans cette catégorie est l'inhibition des enzymes impliquées dans la protéolyse de l'APP, les β et γ -sécrétases où la majorité des molécules sont des inhibiteurs de la β -sécrétase ou BACE-1. Un autre sous-groupe regroupe les agents antiagrégatifs qui empêchent la formation et l'accumulation des plaques amyloïdes (**Figure 42 B**). Une autre catégorie de molécules sont les composés qui affectent l'agrégation de Tau. Il est aujourd'hui clair que les neurofibrilles sont composées d'agrégats de Tau hyperphosphorylé.

2. Agrégation de Tau

De la même manière que pour le traitement anti-amyloïde, des vaccins sont développés et affectent les agrégats de Tau. Le bleu de méthylène et ses analogues sont

connus pour bloquer l'agrégation de Tau. D'ailleurs TauRx un dérivé du bleu de méthylène a complété la Phase II chez les patients AD et est passé en Phase III chez des patients avec des dommages cognitifs. D'autres agents, tels que le TPI-287, un dérivé de Taxane démontre une capacité à stabiliser les microtubules et est actuellement en phase I pour le traitement de stade léger à modéré de la pathologie ainsi que pour d'autres pathologies liées à une déstabilisation du transport cellulaire (**Figure 42 D**).

3. Récepteurs du SNC

Une autre catégorie de molécules affecte les récepteurs dans le système nerveux central. En effet, les cibles de ces potentiels médicaments sont des récepteurs impliqués dans la plasticité neuronale et la transduction de signaux. Souvent, ces molécules sont considérées comme modulateurs du signal affectant les niveaux de transmission synaptiques. La sérotonine ou 5-hydrotryptamine est impliquée dans la régulation d'un grand nombre de fonctions lorsqu'elle se fixe à son récepteur. Parmi tous les récepteurs à la sérotonine deux sous-types (4 et 6) liés à la consolidation de la mémoire et à la cognition concentrent l'attention pour leurs potentiels d'agents anti-AD. Les récepteurs à l'ACh nicotinique (nAChR) et muscarinique (mAChR) sont les cibles de l'ACh dans le cerveau. Ces deux familles de récepteurs sont impactées dans AD. D'ailleurs, il a été montré récemment que l'Aß pouvait interagir avec nAChR, de plus il semblerait que l'expression et la fonction de ces récepteurs soient régulés par leur interaction avec l'A_β. Les composés développés pour cibler ces récepteurs pourraient améliorer les troubles coginitifs des patients AD. Les récepteurs au Lglutamate jouent un rôle crucial dans la transmission et la plasticité synaptique et par conséquent dans l'apprentissage et à la mémoire. La mémantine fait partie de ces composés qui ciblent ces récepteurs au glutamate et notamment les NMDARs. Un seul analogue de la mémantine est en essai préclinique, la nitromemantine. Les AMPARs qui sont aussi des récepteurs au L-glutamate jouent un rôle dans la consolidation de la mémoire et sont la cible de CX-1632, qui est en phase II chez Servier pour le traitement de la démence Alzheimer.

4. Autres stratégies

Les enzymes impliquées dans la transduction du signal neuronal sont aussi la cible de molécules anti-AD. Cette stratégie consiste en l'inhibition des enzymes pour améliorer ou restaurer les signaux de transduction. Historiquement les inhibiteurs de Choline estérase sont les premiers et les plus développés. L'effet de ces inhibiteurs est associé à une augmentation

du temps d'action et de ma concentration en neurotransmetteur au niveau de la clé catalytique, résultant en une potentialisation de l'activation des récepteurs cholinergiques qui sont impactés dans AD. Cependant, cet effet dépend de l'intégrité du neurone présynaptique et à des stades tardifs de la maladie une diminution considérable du nombre de neurones cholinergiques est à noter.

Finalement, aucun nouveau médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer n'a été mis sur le marché depuis 12 ans. Et aucun des traitements actuels ne change le décours de la maladie.

V. Inhibiteurs synthétiques de Caspases, La sélectivité : un réel enjeu

A. Généralités sur les inhibiteurs de protéases

Comme les protéases ont on rôle crucial dans la majorité des voies de signalisation qui régissent les processus biologiques, une dérégulation de leur activité est la cause d'un large panel de pathologies. Les cibles les plus connues d'entre elles sont la thrombine et la plasmine dans les coagulopathies, les métalloprotéases dans le cancer et l'inflammation, ainsi que les Cathepsines, Caspases et le protéasome dans le cancer et les maladies neurodégénératives. Compte tenu de ces observations, la stratégie thérapeutiques générale est d'identifier des inhibiteurs spécifiques, généralement des petites molécules, qui bloquent l'action de la protéase. L'approche communément utilisée est le développement de molécules qui ciblent le site actif en mimant la structure du substrat naturel de l'enzyme sachant que le site actif des enzymes à une grande propension à accommoder les petites molécules organiques. La connaissance de la spécificité de substrats des protéases est essentielle pour l'identification de molécules touches. Généralement, un bon substrat peut être converti en un bon inhibiteur en remplaçant la partie du substrat qui réagit directement avec le site actif de la protéase par une groupement chimique ciblant le mécanisme catalytique. Toutefois, ces méthodes nécessitent une connaissance fine du site actif. D'autres approches ne nécessitent pas la connaissance de la spécificité de substrats. Tel est le cas pour le criblage à hauts débits dont le but est d'obtenir une molécule sélective avec de bons profils de biodisponibilité ou la méthode des fragments qui permet d'identifier de petits fragments qui interagissent généralement faiblement avec leur cible et d'ensuite guider l'optimisation en de bons inhibiteurs en exploitant les informations structurales. Cependant, le manque de sélectivité de ces molécules qui conduisent à des réactions croisées avec d'autres protéases ont ouvert la voie au développement d'inhibiteurs ciblant d'autres site sur la protéase : exosites et site actif. Une autre approche pour le développement d'inhibiteurs consiste en l'utilisation de dérivés d'inhibiteurs naturels, par exemple Les Serpines qui ciblent l'élastase dans le contrôle de la mucoviscidose. Cependant ces molécules sont généralement des inhibiteurs large spectres qui ciblent aussi d'autres protéases. Pour pallier à la faible sélectivité, une alternative est l'identification d'anticorps qui agissent comme des inhibiteurs (Drag M. et al. 2010).

B. Inhibiteurs de Caspases

De nombreuses expériences utilisant des souris transgéniques et des KO ont dans les années 1990, démontré que l'inhibition des Caspases avait un énorme potentiel thérapeutique dans les maladies inflammatoires et dégénératives, notamment la polyarthrite rhumatoïde, les lésions hépatiques, l'infarctus du myocarde et divers troubles neurodégénératifs (Howley B. et al., 2008 ; Wen X. et al., 2012 ; Troy CM *et al.,* 2015 ; Rohn TT 2015)

Si le développement d'inhibiteurs constitue une opportunité sur le plan thérapeutique ce sont aussi de très bons outils nécessaires à la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques qui impliquent chacune de ces protéases.

1. Stratégies

Le principal objectif de cet axe de recherche est de développer des inhibiteurs spécifiques des Caspases avec de bons paramètres pharmacocinétiques répondant à la convention ADMET pour Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité, tout en étant puissant *vis-à-vis* des différentes Caspases. Un inhibiteur idéal serait puissant, avec une constante d'inhibition K₁ inférieure à 10 nM avec une efficacité inhibitrice supérieure à 100.000 M⁻¹.s⁻¹. Pour les inhibiteurs qui agissent de manière irréversible sur leur cible, le rapport k_{inact}/K₁ exprimé M⁻¹.s⁻¹ est utilisé pour quantifier l'efficacité inhibitrice, la détermination de ce rapport est détaillée en partie Matériels & Méthodes. L'inhibiteur idéal serait également sélectif d'une seule caspase avec un index de sélectivité supérieur à 1.000. Ce composé devrait aussi être biodisponible et pharmacologiquement actif *in vivo* (Poręba M. *et al.*, 2013). Cependant, à ce jour, ce composé n'existe pour aucune Caspases. Et pour cause, une structure du site actif relativement bien conservée entre les membres de cette famille d'enzyme, bien que les spécificités de substrat divergent entre Caspases.

Des centaines d'inhibiteurs synthétiques de Caspases ont été développés dans le but d'apporter plus de clarté dans fonctions des Caspases mais aussi pour trouver de nouveaux médicaments. La plupart d'entre eux sont des pseudo-substrats qui bloquent le site actif de l'enzyme cible. Les inhibiteurs allostériques sont une alternative à ces molécules (Kudelova J. *et al.* 2015).

1.1. Inhibiteurs du site actif ou orthostériques

Ces inhibiteurs agissent comme des pseudo substrats et sont des inhibiteurs compétitifs puisqu'ils sont en compétition avec le substrat naturel *vis-à-vis* du site actif de la Caspase cible. Les peptides sont fonctionnalisés avec des groupements chimiques N-ter et C-ter afin de bloquer un acide aminé de l'enzyme et pour favoriser la perméabilité cellulaire, la stabilité ainsi que l'efficacité du composé (Callus B.A. *et al.*, 2007).

1.1.1. Peptides inhibiteurs

La structure des inhibiteurs peut être divisée en trois parties, la région N-terminale (P5)-P4, puis le dipeptide P3-P2 et le groupement P1'en C-ter (Figure 43A). La plupart des inhibiteurs synthétiques sont développés avec un groupement électrophile en C-ter pour établir un lien covalent avec la cystéine catalytique de manière à inactiver l'enzyme. La nature du groupement chimique en P1' conditionne le mécanisme d'action du composé. Ainsi, les peptides aldéhydes, cétones et nitriles sont des inhibiteurs qualifiés de réversibles, où l'enzyme est inhibée par la formation d'un thio-hémiacétal tandis que les dérivés de cétones (les halolméthyl-cétones, les aryloxymethyl-cétone ou acyloxyméthyl-cétone (AOMK)) sont des inhibiteurs irréversibles qui inactive l'enzyme de manière permanente via la formation d'un adduit thioether (Figure 43B). D'autres composés présentent un profil d'inhibition bimodal où un thio-hémiacétal est transformé lentement en un thioether. Les conditions à respecter pour une protéolyse efficace par les Caspases est d'une part, la présence d'un Asp en P1 et d'autre part, la reconnaissance d'une séquence tétra- ou pentapeptidique en amont de la liaison scissile. Le développement des inhibiteurs peptidiques de Caspases se base donc sur ce modèle avec l'introduction d'acides aminés non naturels ou une variation au niveau de la chimie du groupement en N-ter ou C-ter. La spécificité de l'inhibition est associée à l'optimisation de la chaîne en amont de l'électrophile P1'.

De manière intéressante, les groupements électrophiles avec une bonne réactivité vis-à-vis d'autres protéases sont peu efficaces sur les Caspases. Tel est le cas pour les groupements P1' vinyl-sulfone et accepteurs de Michael qui sont très efficaces sur les Cathepsines et les protéases du clan CA. En revanche, les aza-epoxides et les aza-accepteurs de Michael montrent une bonne réactivité vis-à-vis des Caspases.



Figure 43. Organisation et mécanisme d'action des inhibiteurs peptidiques de Caspases. (A) Plusieurs classes d'inhibiteurs réversibles et irréversible ont été identifiées pour les Caspases en utilisant des stratégies qui avait montré leur efficacité sur d'autres protéases à cystéines. La structure des inhibiteurs peut être divisée en trois parties, la région N-terminale (P5)-P4, puis le dipeptide P3-P2 et un groupement électrophile P1'en C-ter. (B) Mécanismes d'inhibitions des inhibiteurs réversibles et irréversibles.

1.1.1.1. Inhibiteurs de première génération – peptides aldéhydes

En se basant sur la classification en trois groupes, établie par Nancy Thornberry *et al.,* sur les séquences préférentiellement reconnues par les Caspases, une première génération d'inhibiteurs aldéhydes a été développée. Ainsi les peptidesaldéhydes Ac-WEHD-CHO et Ac-DEVD-CHO/Ac-VDVAD-CHO contiennent les séquences optimales pour les Caspases des groupes I et II, respectivement. Tandis que l'inhibiteur Boc-IETD-CHO possède la séquence consensus reconnu par les enzymes du groupe III. Toutes ces molécules sont des inhibiteurs, réversibles, compétitifs dont le mécanisme d'action est basé sur l'établissement d'un lien covalent transitoire, facilement hydrolysable, avec la cystéine catalytique. De manière intéressante, les aldéhydes ne semblent pas de se lier dans une conformation de l'état de transition, où classiquement l'oxyanion du thio hémiacétal est stabilisé au niveau du trou oxyanion. En effet, pour les aldéhydes, l'oxyanion participe à l'établissement d'un réseau de

liaisons hydrogène qui implique l'histidine catalytique (Garcia-Calvo M. *et al.,* 1998). Cependant, d'un point de vue pharmacologique, les inhibiteurs aldéhydes présentent un faible potentiel thérapeutique compte tenu de leur mauvaise solubilité, stabilité et puissance d'inhibition. De plus, la forte réactivité de l'aldéhyde entraîne des réactions croisées avec d'autres bionucléophiles, impactant considérablement la sélectivité.

1.1.1.2. Inhibiteurs de seconde génération – Les halométhylcétones

L'optimisation du groupement électrophile dans le but d'améliorer la perméabilité, la stabilité et l'efficacité des composés a permis de mettre en évidence que les cétones α-substituées telles que les halométhyl-cétones – Chloromethylketone (cmk) ou fluoromethylketone (fmk) - étaient de très bons inhibiteurs de Caspases.

La fonctionnalisation autour d'un O-méthyl-Asp peut servir d'inhibiteur, tel est le cas pour le Benzozylcarbonyl-aspartyl(OMe)-Fluoromethylketone (Boc-D-fmk), mais l'Asp est souvent inclus dans un tri- (z-VAD-fmk) ou tétrapeptide (Ac-YVAD-fmk).

Le z-VAD-fmk et les molécules associées avec un Asp en P1 sont devenus des inhibiteurs très populaires de Caspases. Ces molécules inhibent l'enzyme cible de manière irréversible en formant une liaison thioester avec la cystéine catalytique où l'oxyanion formé occupe le trou oxyanion -formé par Cys-285 et un résidu Gly – de la protéase dans l'état de transition. L'utilisation de ces inhibiteurs, en recherche fondamentale et appliquée, depuis leur introduction a été considérable, aussi déjà en 2001 plus de 600 publications rapportaient leurs applications (Van Noorden C.J.F. 2001). D'ailleurs, les tétrapeptides inhibiteurs z/Ac-DEVD-fmk, Ac-YVAD-fmk aussi bien que l'inhibiteur large spectre z-VAD-fmk sont les inhibiteurs les plus utilisés dans la recherche et ont largement contribués à la compréhension des pathologies liées à l'apoptose dans de nombreux modèles. Aussi, l'effet de ces inhibiteurs dans la neuroprotection a pu être mis en évidence dans des modèles d'AVC, où Boc-D-Asp protège les rats nouveau-nés des lésions créées suite à une hypoxie-ischémie lorsqu'il est administré 3h après les dommages. Les z-VAD-fmk et Ac-DEVD-fmk sont aussi protecteurs d'ischémies focales bien que ces inhibiteurs soient beaucoup moins efficaces dans des modèles d'ischémies focales sévères (Onténiente B. 2004 ; Kudelova J. *et al.*, 2015).

En comparaison aux aldéhydes, les inhibiteurs fmk témoignent d'une bonne perméabilité, de par la présence d'un groupement *O*-Methyl, qui prévient de la dégradation. Ils constituent des inhibiteurs puissants et large spectre des Caspases. Cependant leur manque de sélectivité,

leurs effets croisés sur d'autres protéases à cystéines et parce qu'ils sont toxiques *in vivo*, du fait de la production de fluoroacétate qui inhibe l'aconitase, font que ces inhibiteurs ne sont exploitables qu'à des fins de recherche.

1.1.1.3. Inhibiteurs de troisième génération - Q-VD-OPh

De nombreux inhibiteurs de Caspases sont hydrophobes et donc peu perméables, par conséquent l'augmentation de la concentration pour avoir un effet biologique peut entraîner une toxicité de la molécule.

L'ajout d'un groupement *O*-phenox (Oph) en C-terminal et d'un groupe carboxy-quinolyl (Q) en N-ter de la séquence d'un peptide inhibiteur améliore considérablement son efficacité. C'est en effet le cas pour l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh (**Figure 44**), où un dixième de la concentration classiquement utilisée pour le Boc-D-fmk suffit à inhiber efficacement l'activité Caspase. Il est capable de prévenir de l'apoptose initiée par les voies intrinsèque, extrinsèque (signalisation Fas) et suite à un stress du RE. *In vitro*, Q-VD-OPh inhibe les Caspases recombinantes -1, -3, -8 et -9 avec des IC₅₀ qui varient entre 25 et 400 nM.

Compte tenu de toutes ces information, l'optimisation des propriétés du groupe partant, *O*-phenoxy, fait que cet inhibiteur est encore plus réactif *vis-à-vis* de la Cystéine catalytique, expliquant ainsi sa meilleure efficacité. Et d'un autre côté, la présence du carboxyquinolyl- en N-ter améliore considérablement la perméabilité du composé, permettant ainsi de diminuer les doses *in vitro* et *in vivo*, d'ailleurs ce composé est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Caserta T.M. *et al.*, 2003 ; Chauvier D. *et al.*, 2007 ; Callus B.A. *et al.*, 2007).

Figure 44.

Structure du Q-VD-OPh

1.1.2. Peptidomimétiques

L'usage de peptides inhibiteurs est limité pour le développement de médicaments. Et pour cause : leur faible perméabilité due à la structure peptidique et à la présence d'acides carboxyliques, une activité limitée et le manque de stabilité causé par une dégradation rapide. Malgré d'importantes optimisations pour améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques, cela reste insuffisant pour une application thérapeutique. Afin de s'affranchir de ces paramètres de nombreuses approches ont été employées : (i) réduction de la nature

peptidique de ces inhibiteurs par l'usage de composés mimant le squelette peptidique, (ii) modification du groupement électrophile en P1', tout en conservant un Asp en P1. L'application de ces critères résulte en le développement de nombreux peptidomimétiques et inhibiteurs non peptidiques sur la base de structure hétérocycliques : isatine sulphonamide, aza-peptide epoxides, nenzyl- et cyclohexyl-amines, pyrazizone mono-amindes). *In vivo* ces composés montrent de meilleurs paramètres d'efficacité, de sélectivité et de stabilité. D'ailleurs quelques composés sont entrés en clinique, comme IDN-6556 et VX-765 (**Table 7**). Des compagnies telles que IDUN Pharmaceuticals, Inc ; Vertex Pharmaceuticals, Inc ; Merck Frosst et GlaxoSmithKline (GSK) se sont initialement intéressés au développement d'inhibiteurs de CASP-1 afin de produire des agents anti-inflammatoires, à présent ce sont tous les membres de la famille des Caspases qui attirent les industriels, pour le traitement des pathologies inflammatoires aigues et chroniques, et les maladies auto-immunes et les maladies cardiovasculaires (Kudelova J. *et al.*, 2015). Quelques exemples de ce type d'inhibiteur sont présentés en **Figure 45**.



Figure 45. Structure des peptidomimétiques inhibiteurs de Caspases en essai clinique.

Ces composés inclus le VX-750 et le Pralnacasan qui sont des inhibiteurs réversibles de la CASP-1. Emricasan est un inhibiteur large spectre de Caspases. Et NCX-1000 est un donneur oxyde nitrique.

1.1.3. Aza-peptides époxydes et Accepteurs de Michael

Pour les inhibiteurs de Caspases halométhyl-cétones notamment, le principal défaut concerne le manque de sélectivité. En effet, ces composés avec leurs séquences pourtant préférentiellement reconnues par les Caspases sont aussi de bons inhibiteurs d'autres protéases à cystéines telles que les Cathepsine B, L et S.

Les aza-peptides sont des peptides avec des aza-acides aminés c'est à dire que le Carbone α est remplacé par un azote. Le laboratoire de Powers J.C. a mis en évidence que les aza-

peptides époxydes – avec un époxyde en P1' - étaient de bons inhibiteurs spécifiques des protéases à cystéines du clan CD. En effet, ce groupement électrophile associé à des motifs reconnus par les Caspases ne sont pas reconnus par d'autres protéases à cystéines telles que les Cathepsine B et Calpaïne. Aussi, sur la base de ces molécules ils ont développé des azapeptides inhibiteurs contenant des accepteurs de Michael en P1'. En termes de structures, ces deux catégories d'inhibiteurs sont construites pour ressembler à la séquence optimale du substrat, toutefois, le Carbone α de l'Asp en P1 est converti en un azote et le groupement électrophile est un époxyde ou un accepteur de Michael (**Table 5**). Le mécanisme d'inhibition employé par ces molécules est une thioalkylation de la cystéine catalytique suite à l'attaque nucléophile. De nombreux groupements électrophiles ont été développés et testé sur les Caspases et aucun d'entre eux n'a d'effet sur d'autres protéases à cystéines.

Table 5. Exemples multiples de groupes partant époxydes et accepteurs	de Michael. Ekici	Ö.D. et al.
2002 et Poreba M. <i>et al.,</i> 2015		
	5	

$ \begin{array}{c} H \\ R \\ N \\ R_{2} \\ H \\ 1 \end{array} $ $ \begin{array}{c} R_{1} \\ R_{1} \\ R_{1} \\ R_{2} \\ H \\ R_{2} \\ 1 \end{array} $	$H \xrightarrow{O} R^{1}$ $R^{N} \xrightarrow{I} R^{2}$	
aza-peplide epoxide		
Cbz-Asp-Glu-Val-azaAsp-EP-R - caspase 3/7 specific sequence	Cbz-Asp-Glu-Val-azaAsp-CH=CH-R- caspase 3/7 specific sequence	
- COOEt	-COOEt (cis)	
- CO-Phe-NH ₂	-COOEt (trans)	
- CONHCH ₂ Ph	-CON(CH ₃)CH ₂ Ph	
- COOCH ₂ Ph	-CON(CH ₂ Ph) ₂	
Cbz-Ile-Glu-Thr-azaAsp-EP-R - caspase 6/8 specific sequence	-CON(CH ₂ -1-Naphth) ₂	
- COOEt	Cbz-Ile-Glu-Thr-azaAsp-CH=CH-R - caspase 6/8 specific sequence	
- COOCH ₂ Ph	-COOEt	
- CONHCH ₂ Ph	-COOCH ₂ Ph	
- CO-Ala-NHCH ₂ Ph	-CONHPh	
	-CON(CH ₃)CH ₂ Ph	
	-CON(CH ₂ Ph) ₂	
	Cbz-Leu-Glu-Thr-azaAsp-CH=CH-R- caspase 8 specific sequence	
	-COOEt	
	-COOCH ₂ Ph	
	-CONHPh	
	-CON(CH ₃)CH ₂ Ph	
	-CON(CH ₂ Ph) ₂	
	-CON(CH ₃)CH ₂ 1naphth	

1.1.4. Petites molécules

En alternative aux peptidomimétiques, des petites molécules organiques ont été étudiées pour leur potentiel à inhiber les Caspases. Certaines familles chimiques présentent une bonne

combinaison entre forte affinité pour les Caspases et bonnes propriétés pharmacocinétiques. Ce groupe d'inhibiteurs organiques regroupe des dérivés d'indole, isatines ; des indolones, isoquinoline-1,3,4-triones, quinolines, quinazolines, pyridazines quinones et d'autres (**Figure 46**). La plupart de ces molécules agissent en inhibiteurs réversibles et partagent, souvent, le même mécanisme d'action.





Les noyaux **isatines** et **indolones** sont de petites molécules organiques qui agissent comme agents alkylants du groupement thiol de la cystéine catalytique. Leur mécanisme d'action est basé sur la formation d'un intermédiaire tétraédrique qui se forme entre le carbonyle du cycle de l'isatine ou de l'indolone avec la cystéine catalytique. Les inhibiteurs contenant un noyau isatine ou indolone constituent un point de départ très intéressant pour le développement d'inhibiteurs puissants et affins puisqu'ils peuvent être facilement fonctionnalisés (Lee D. et al.,2000, 2001). Avec un tel rationnel, des composés réversibles avec des efficacités de l'ordre du nanomolaire sur les CASP-3, -7 et -9, avec des Ki de respectivement 1,2 ;7 et 120 nM ont été obtenus. De plus, le composé est effiace au micromolaire sur les autres Caspases testées. Les valeurs des constantes d'inhibition Ki sont utilisées pour définir l'éfficacité inhibtrice des composés réversibles. Les détails sur cette contante sont développés en partie Matériels et Méthodes.

Un autre noyau qui a démontré une bonne inhibition des Caspases sont les **dérivés 1,2-benzisothioazol-3-one**. Suite à un criblage de 4000 molécules sur la CASP-3 l'un de ses dérivés a montré un potentiel inhibiteur avec une IC_{50} de 46 μ M. L'incorporation d'un cycle 1, 2, 3-triazole à partir d'un dérivé 1,2-benzisothioazol-3-one permet d'augmenter considérablement l'efficacité envers la CASP-3, avec une IC_{50} de 11 nM (Liu D. et al., 2013 ; Guo Z. et al., 2015).

Les dérivés de noyaux **quinolines** et **quinazolines** sont aussi des inhibiteurs potentiels de Caspases. Le dérivé de quinoline, 1,3-Dioxo-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4]quinoline est le composé de base qui a permis l'obtention de composés avec une IC₅₀ pouvant aller jusqu'à 3 nM sur la CASP-3 (Kravchenko D.V. et al., 2005). Les dérivés de ce dernier agissent en inhibiteurs réversibles non-compétitifs, c'est à dire qu'il se lie avec la même affinité à l'enzyme seule et à l'enzyme complexée au substrat. En termes de mécanisme, l'attaque nucléophile du groupement thiol de la cystéine catalytique se fait au niveau du carbone de l'imide aromatique.

Les dérivés de quinazolines sont aussi connus pour leur capacité à inhiber les Caspases. À partir de ce noyaux, l'obtention de composé anilinoquinazoline a permis d'obtenir des composés efficaces sur les CASP-3 et CASP-6, avec des Ki qui varient entre 88 et 247 nM sur la CASP-3 (Scott C.W. et al., 2003). Un composé qui inhibe la CASP-3 avec une efficacité de 425 nM est permet également de réduire l'activité CASP-3 dans des lignées SH-SY5Y où l'apoptose est induite par la staurospaurine.

Enfin, les dérivés d'**isoquinoline-1, 3, 4-trione** sont des inhibiteurs réversibles *slow-binding*, caractérisés par une formation/dissociation lente du complexe Enzyme/Inhibiteur. Du point de vue du mécanisme d'action, ces derniers agissent comme les dérivés de quinolines.

1.2. Inhibiteurs allostériques

Comme évoqué précédemment, bien que la stratégie d'inhibition du site actif soit pertinente en termes d'efficacité d'inhibition elle peut être tout même confrontée aux problèmes de sélectivité. Ainsi, l'inhibition allostérique des Caspases est une bonne alternative au ciblage du site actif dans le sens où les inhibiteurs allostériques sont souvent très sélectifs. Ce type d'inhibiteur exerce son effet en se fixant sur un autre site que le site actif de la protéase (exosites ou sites allostériques) en entraînant la déstabilisation de la dyade catalytique Cys-His. La conformation utilisée pour affecter l'activité Caspase est la conformation fermée de la boucle L2'. Dans cette organisation, l'agencement des boucles au niveau du site actif empêche la formation du site actif. Suite au clivage de maturation du linker des grande et petite sous-unités, L2' reste insérée à l'interface du dimère pour beaucoup de Caspases. Par conséquent une modification de la structure des boucles qui forment le site actif peut être réalisée à tout moment, c'est-à-dire sur le zymogène, sur l'apo-enzyme ou sur la forme active) (Clark A.C. 2016). Une excellente illustration du mode d'action d'un inhibiteur

allostérique est l'inhibition de la CASP-2 par la protéine recombinante DARpin (*designed ankyrin repeat protein*). Cette dernière se lie à ses cibles à la manière d'un anticorps. La forte spécificité de l'interaction s'explique par le fait qu'elle se fixe à deux régions flexibles en surface de CASP-2, au niveau de la boucle L4 et en N-ter du brin β 5 dont l'ensemble forme l'arrière du site actif (**Figure 47**) (Schweizer A. *et al.*, 2007). Ce long peptide naturel n'est toutefois absolument pas développable et ne pourra pas constituer un bon candidats médicament.

L'interface de dimérisation, c'est environ 2.000 Å enfouis, avec une cavité centrale remplie d'eau sur un face et d'hélices_{α} sur l'autre face. Des interactions entre les résidus chargés dans les hélices_{α} stabilisent l'édifice. La majorité de ces interactions ont lieu au niveau des petites sous-unités, plus précisément entre les brins β 8 et β 8' qui encadrent la cavité centrale. Toutes les interactions qui ont lieu au niveau de cette interface, réseau de liaisons hydrogènes, ponts salins, interactions hydrophobes, conditionnent la stabilité du dimère. Bien que les structures tridimensionnelles des Caspases soient relativement similaires, l'interface de dimérisation est propre à chacune et peut donc être exploitée pour le développement d'inhibiteurs allostériques (MacKenzie S.H. et al., 2012). D'ailleurs, le domaine BIR3 de l'inhibiteur endogène XIAP inhibe la CASP-9 en prévenant de l'activation de l'enzyme en se fixant au niveau de l'interface de dimérisation. L'interface des CASP-3 et -7 contiennent des poches qui peuvent être ciblées pour bloquer l'enzyme dans sa conformation active. Deux classes de composés ont été identifiés : FICA (5-fluoro-1H-indole-2-carboxylic acid (2-mercapto- ethyl) amide) et DICA (2-(2,4-dichlorophenoxy-N-(2-mercapto-ethyl)-acétamide. Ces deux composés réagissent avec la Cys-264 de la CASP-3. Ce résidu est localisé à proximité de l'interface de dimérisation et à 14 Å de la cystéine catalytique. La liaison de ces molécules n'entraîne pas une dissociation du complexe mais empêche la liaison du substrat au niveau du site actif. Pour la CASP-7, FICA interagit avec la Tyr-223' du monomère opposé à celui auquel il est lié, occupant ainsi la cavité centrale entre les deux monomères. Tandis que DICA interagit avec la Tyr-223 du monomère sur lequel il est fixé. Pour les deux inhibiteurs les conséquences conformationnelles sont les mêmes, en déplaçant la Tyr-223 au niveau de l'interface de dimérisation, l'Arg-187 (sous-site S1 de l'enzyme) de la boucle L2 du site actif est éjectée de la cavité centrale et se place dans une position qui bloque la liaison du substrat au site actif. Cette conformation de la CASP-7 suite à son interaction avec DICA ET FICA est semblable à celle du zymogène (Hardy J.A. et al., 2004).





2. Sondes d'activités Caspases

Le développement de sondes d'activité est une discipline relativement récente qui utilise de petites molécules ou peptide pour détecter et suivre l'activité des enzymes (Serim S. et al., 2012 ; Poręba M. *et al.*, 2015). La structure type d'une sonde d'activité est motif peptidique ou peptidomimétique qui mime souvent les séquences des substrats naturels associé à un groupement électrophile en C-ter. Ces sondes se lient donc directement à l'enzyme, par l'intermédiaire d'un groupement électrophile, en formant un lien covalent avec la chaîne latérale du résidu catalytique nucléophile (Cys, Ser ou Thr). Les sondes sont fonctionnalisées en N-ter avec un groupement rapporteur d'activité, qui permet de révéler si la sonde est liée au site actif ou non (**Figure 48**). Les groupements les plus populaires sont des radioisotopes, des groupes fluorescents ou luminescents qui rendent directement de l'activité enzymatique. De cette façon, les zymogènes ou les autres formes inactives de la protéase ne seront pas détectés, facilitant ainsi l'étude spécifique de l'activité enzymatique au cours de divers processus biologiques plutôt que de mesurer des taux globaux de protéine.

Les sondes biotinylées ont été les premirs outils utilisés pour le suivi de l'activité Caspases *in vitro* (Faleiro L. et al., 1997). Et pour cause, leur forte affinité avec la streptavidine qui permet une détection sélective et rapide. Cependant l'utilisation de la biotine présente

certaines limites, le principal problème étant que la biotine n'est pas adaptée aux études *in vivo* et *in situ* en raison de sa faible perméabilité cellulaire et du mode de détection indirect. De plus, la présence de polypeptides biotinylés endogènes peut également fausser les résultats. Bien qu'elles ne puissent pas être utilisée dans des cellules intacts ces sondes ont été utiles pour la détection de l'activité Caspases dans des lysats cellulaires suite à l'induction de l'apoptose. Pour cela, les sondes suivantes ont été utilisées : biotin-VAD-cmk, biotin-YVAD-aomk, Cbz-EK(biotin)D-fmk, ainsi que biotin-DEVD-cmk.

Contrairement aux sondes biotinylées, les radioisotopes, notamment l'iodotyrosyl ou ¹²⁵I, peuvent être utilisés *in vivo*. En effet, ils peuvent être facilement insérés dans la structure d'un peptide inhibiteur sans toutefois modifier les propriétés physique et biochimique du peptide initial compte tenu de leur petite taille. Enfin, ces sondes peuvent être directement détectées par des méthodes classiques d'autoradiographie. Par exemple la sonde iodotyrosyl-VD- fmk a été utilisée pour montrer l'activation des Caspases dans des tissus animaux.

L'idée des sondes fluorescentes a émergé dans les années 2000 grâce aux travaux de Darzynkiewicz. Dans leurs études ils ont utilisé des inhibiteurs de Caspases couplé à des fluorophores (FLICA) pour détecter spécifiquement les Caspases dans les cellules apoptotiques (Smolewski P. et al., 2001). Ces sondes fluorescentes ont le principal atout d'être très solubles dans les solvants aqueux et présentent de bonne propriété de perméabilité. L'une des premières approches employées est le développement des sondes FLICA pour *fluorochrome-labeled inhibitors of caspases* où la séquence de l'inhibiteur large spectre VADfmk est associée à la carboxyfluorescine (FAM), à la fluorescein isothiocyanate (FITC- vert), ou à la sulforhodamine B (SR - rouge).

Cependant, au même titre que le développement d'inhibiteurs spécifiques, le challenge dans le *design* de sondes spécifiques d'activité Caspases est limité par la conservation des sites actifs entre Caspase. Ainsi, le développement d'inhibiteurs sélectifs constituerait un apport considérable pour le développement de sonde d'activités spécifiques.



Figure 48. d'activités.

. Organisation générale « type » des sondes s.

La sonde est développée pour se lier à l'enzyme de la même manière que le substrat mais le groupement electrophile en P1' (*Warehead*) se lie de manière irréversible au résidu catalytique de la protéase. En N-ter un groupement rapporteur d'activité permet de suivre directement ou non l'activité Caspase *in vitro* ou *in vivo*.

C. Inhibiteurs de Caspases : Outils pour la recherche et pour le développement clinique

1. Inhibiteurs en tant qu'outils

L'apport des inhibiteurs de Caspases a été considérable pour la compréhension des rôles des Caspases dans la mort cellulaire physiologique et pathologique aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Une partie des mécanismes de mort impliquant les Caspases dans diverses pathologies et élucidés grâce aux inhibiteurs est présenté en **Table 6**. Dans les modèles animaux l'inhibition des Caspases s'est révélée être bénéfique dans le cas de septicémie, hépatites et de pathologie neurodégénératives.

 Table 6. Pathologies associées à une dérégulation de l'activité Caspase mise en évidence grâce à des inhibiteurs de Caspases. Kudelova J. et al., 2015.

DISEASE GROUP	DISORDERS	ANIMAL MODELS	CASPASE INHIBITORS	
Excessive caspase activity				
	Alcoholic hepatitis (AH)	Dila duet liested mense marine	Z-VAD-FMK (25), MX1122 (25), YVAD-CMK (26)	
Liver diseases	Hepatitis B (HBV), C (HCV)	blie duct ligated mouse, massive	IDN-6556 (108)	
Liver discuses	Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)	in rat rodent models of acute liver injury	VX-166 (23)	
	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	in rul, rodoni models or dedie nver nijury	VX-166 (23)	
Lung diseases	Asthma	Model of OVA-sensitized/challenged	Z-VAD-FMK (29)	
Lung uiseases	Lung fibrosis	Injection of bleomycin	Z-VAD-FMK (30, 140)	
	Stroke	Cerebral artery occlusion	Boc-Asp-FMK (48), Z-VAD-FMK (49), LEHD- CHO (53), M826 (54), VRT-018858 (55), Q-VD- OPH (56, 57), TRP601 (59), IDN-5370 (139)	
Ischemia-reperfusion damage	Transplantation	Liver, lung, kidney, pancreatic islet	Z-Asp-CMK (44), IDN-6556 (45,84-87), Ac- YVAD-CMK (47), Z-VAD-FMK (141)	
	Myocardial infarction Coronary occlusion, microembolization		YVAD-CHO (46), DEVD-CHO (46), MMPSI (50), Z-VAD-FMK (51), Z-LEHD-FMK (52)	
	CNS traumatic injury Fluid-percussion t spinal cord injury		Z-VAD-FMK (62, 66), Q-VD-OPH (67), Z- DEVD-FMK (63, 64, 68), Ac-DMQD-CHO (69), Z-LEHD-FMK (70, 71)	
Neurological diseases	Huntington's disease (HD)	Injection of malonate, MPTP	Q-VD-OPH (82), M826 (83)	
_	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Human SOD1 transgenic mice	Z-VAD-FMK (81)	
	Alzheimer's disease	TgCRND8 mice	Q-VD-OPH (82)	
	Parkinson's disease	Injection of MPTP	Z-VAD-FMK (137), Q-VD-OPH (138)	
Inflammatory and	Rheumatoid arthritis (RA), Osteoarthritis (OA)	Injection of bacterial collagenase	VX-740 (27, 28)	
		Cecal ligation and puncture, endotoxin	Z-VAD-FMK (31, 33, 37, 39, 40), M867 (38), Z-	
initiale diseases	Septic shock	from E. coli, injection of S. aureus	DEVD-CMK (39), Z-LEHD-FMK (40), VX-166	
			(43)	
Decreased caspase activity	·			
Cancer	Leukemia, solid tumors	Breast, lung cancer xenograft model	M867 (91), Z-VAD-FMK (92), Q-VD-OPH (93)	

2. Inhibiteurs de Caspases en essais cliniques.

Compte tenu de la faiblesse des paramètres pharmacocinétiques des peptides inhibiteurs tous les composés en essai cliniques sont des peptidomimétiques et son présentés en **Table 7**. (Onténiente B. 2004 ; Fischer U. *et al.,* 2005 ; MacKenzie S.H. *et al.,* 2010).

Le premier inhibiteur à entrer en essai clinique est le Pralnacasan ou **VX-740** (Vertex Pharmaceuticals, Inc). Pralnacasan est une pro-drogue administrée oralement qui permet la formation d'un métabolite actif qui inhibe réversiblement et spécifiquement la CASP-1. Il a été développé dans le cadre de traitement de l'arthrose et de la Polyarthrite rhumatoïde. Sa structure est dérivée de la séquence préférentiellement reconnue par CASP-1, YVAD. Les

études pré-cliniques ont démontré qu'il inhibait spécifiquement la CASP-1 avec une IC₅₀ de 1,3 nM contre des valeurs au micromolaire pour les CASP-3 et -8. Dans les études initiales en Phase I/IIa, le composé est bien toléré chez les sujets sains volontaires et les patients atteints de OA et RA. De plus, le médicament présentait une bonne biodisponibilité, aucune toxicité apparente et réduisait les symptômes et l'inflammation des patients avec une RA. Cependant, les essais se sont interrompus en Phase IIb, en raison d'une toxicité hépatique observée dans les modèles animaux après une exposition prolongée au médicament bien qu'aucun effets indésirables n'aient été à déplorer chez les participants à l'essai, et ce, même après une exposition prolongée.

VX-765 ou Belnacasan, un autre inhibiteur réversible spécifique de CASP-1 développé pour le traitement des maladies inflammatoires. Les études précliniques ont révélé qu'il est plus efficace que le Pralnacasan pour l'inhibition de la réponse inflammatoire avec une IC₅₀ deux fois plus faible que celle observé pour le Pralnacasan. En phase I, les essais ont démontré une réduction dose dépendant des taux circulant de cytokines dans le plasma et en Phase II il a démontré sa non toxicité, sa tolérance ainsi que son efficacité. En revanche, le composé ne semble pas efficace pour le traitement de l'épilepsie.

La société IDUN, racheté par Pfizer, a développé un grand nombre d'inhibiteurs larges spectres de Caspases (IDN-8066, -7503, -7436, -1965, -6556). Parmi eux, **IDN-6556 (Emricasan**, Conatus Phamaceuticals) est un inhibiteur large spectre irréversible avec un intérêt thérapeutique pour le traitement de l'hépatite C et des rejets de transplantation du foie. Les études précliniques menées sur ce composé ont démontrées que l'administration orale du composé améliorait la cirrhose du foie en inhibant l'apoptose des hépatocytes. Lors d'essai clinique sur des patients atteints d'hépatite C, le traitement avec Emricasan a démontré son efficacité sans déclencher d'effets indésirables. En 2013, le composé est entré en Phase II pour des patients avec une hépatite alcoolique aiguë et en 2014, en Phase II les études de pharmacocinétique et dynamique ont débutées pour des insuffisances hépatiques aigues et chroniques. En plus des pathologies hépatiques, IDN-6556 est également entré en essai clinique pour la transplantation d'îlots comme traitement pour le diabète afin de minimiser l'apoptose précoce qui survient après la transplantation.

Le **GS-9450** (Nivocasan), un inhibiteur irréversible des CASP-1, -8 et -9 a été développé dans le cadre des pathologies hépatiques. En phase I, l'administration à des sujets sains volontaires a prouvé que le composé était non toxique et bien toléré. Les tests d'efficacité de tolérance

et de pharmacocinétique ont été entrepris en Phase II pour le traitement de l'hépatite C et de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Dans les deux cas, le Nivocasan a montré une efficacité mais les essais ont été interrompus lors de la mise en évidence de lésions hépatiques suite à une longue exposition (6mois) du composé chez les patients atteints de l'hépatite C.

NCX-1000 est un composé anti apoptotique qui inhibe les CASP-3, -8 et -9 qui est entré en Phase IIa pour le traitement de l'hypertension portale. Cependant, bien que le composé soit bien toléré, son administration orale pendant 16 jours n'a pas montré d'effet sur la pathologie, sans doute en raison d'une faible sélectivité.

Le composé M-867 développé par Merck-Frost, est un inhibiteur réversible des CASP-3 et -7. Cependant, bien qu'il soit capable de bloquer les phénotypes d'une mort par apoptose *in vivo*, il est inefficace dans la prévention de la mort cellulaire (Kudelova J. *et al.*, 2015).

Le développement d'inhibiteurs du site actif repose sur la nécessité d'avoir un Asp en P1 pour toutes les Caspases. Les chercheurs se sont concentrés sur des inhibiteurs de l'interface de dimérisation. Ainsi, des chercheurs de Sunesis ont développé un nouveau composé, composé 34, qui forme un lien covalent avec une cystéine à l'interface de dimérisation de la CASP-1. Cette molécule est semblable au domaine BIR3 de XIAP Callus B.A. *et al.,* 2007 ;).

DRUGS company	STRUCTURE AND SUBSTRATE SPECIFITY	PRECLINICAL DATA	CLINICAL TRIALS	CLINICAL TRIALS RUNNING/TERMINATED
Pralnacasan VX-740 Vertex Pharmaceuticals	Prodrug of orally active reversible peptidomimetic casp-1 inhibitor	 Collagenase-induced OA (27) Type II collagen-induced arthritis in mice Dextran sulfate sodium-induced colitis in mice (101) 	- Rheumatoid arthritis and osteoarthritis (significant amelioration of RA, but not OA)	- Terminated in Phase IIb in RA due to liver toxicity in animals (102)
Delesson		- Mouse models of acute seizures and chronic epilepsy (134)	- Completed Phase II in psoriasis	- Any results released
VX-765 Vertex	Prodrug of orally active reversible peptidomimetic	- Dermatitis model - Arthritis model (103)	- Completed Phase II in resistant partial epilepsy	
Pharmaceuticals	casp-1 inhibitor	 Prevents CD4 T-cell pyroptotic death in a dose-dependent manner in HIV-infected lymphoid tissues (136) 	- Evaluated the efficacy and safety Phase IIb in resistant partial epilepsy	- I erminated Phase IIb due to lack of efficacy
			- Completed Phase II in NASH	- Reductions in ALT levels in NASH patients (6)
Nivocasan GS-9450	Orally active irreversible peptidomimetic casp-1,	 Fibrosis/apoptosis animal models Bleomycin induced pulmonary 	- Completed Phase IIa in chronic HCV	- Terminated Phase IIb due to significant laboratory
Gilead Sciences	-8, -9 inhibitor	fibrosis in mice (132)	- Evaluated the efficacy and safety Phase II in chronic HCV	study participants
			- Completed Phase II in	- Efficacy in post liver transplant for chronic HCV (108, 109)
			treatment HCV	 Pharmacokinetics and pharmacodynamics Phase II in ACLF (111)
Empirezen	 San Orally active broad spectrum irreversible in hibitor - α-Fas model of apoptotic hepatitis in mice - Bile duct ligated model of liver failure, injury, fibrosis in mice (133) - Post transplantation - liver, islets (7) - Models of NASH NAFL D (133) 	- α -Fas model of apoptotic hepatitis in mice	- Completed Phase II of safety and efficacy in patients undergoing liver transplantation	- Efficacy and safety Phase II in NAFLD and raised transaminases
IDN-6556			-Terminated Phase II in severe AH and contraindications to steroid therapy due to inadequate dose of Emricasan	
Pharmaceuticals			- Safety Phase I/II in islet transplantation in type I diabetic participants (112)	
	- Models of NASH, NAPLD (155, 135)			 Pharmacokinetics and pharmacodynamics Phase I in subjects with severe renal impairment and matched healthy volunteers
				 Pharmacokinetics and pharmacodynamics Phase I in subjects with hepatic impairment and matched healthy volunteers

Table 7. Application clinique des inhibiteurs de Caspases (Kudelova J. et al., 2015)

D. Vers des inhibiteurs sélectifs de la Caspase-2?

1. Inhibiteurs irréversibles sélectifs du groupe II

En 2004, afin de développer un inhibiteur préférentiel des caspases du groupe II (CASP-2, 3, 7), l'équipe de Jacotot E. et al., ont combiné les extrémités amino- et carboxy- terminales du Q-VD-OPh au motif -VDVAD-, préférentiellement reconnu par CASP-2. De plus, dans le but d'améliorer le passage de la barrière hémato-encéphalique et d'augmenter la demi-vie du composé en limitant la protéolyse, des groupements méthyl-ester (O-CH3) ont été greffés sur les chaînes latérales des résidus Asp. Le dérivé penta-peptidique résultant de ce design rationnel est le Q-VD(OCH3)VAD(OCH3)-OPh, baptisé TRP601, qui inhibe les CASP-2 et -3 de manière irréversible. Les analyses cinétiques réalisées in vitro révèlent un fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis des CASP-2 et -3. De manière intéressante, l'un de ses métabolites déméthylés, le ΔMe-TRP601 (appelé aussi TRP-604) témoigne d'une efficacité d'inhibition encore plus forte vis-à-vis de ces 2 enzymes. Dans plusieurs modèles de lésions cérébrales néonatales (excitotoxique, hypoxie-ischémie, ischémie-reperfusion, et hyperoxie), l'inhibition des CASP-2 et -3 par le TRP601 protège le cerveau de rongeurs nouveau-nés de ces dommages. De plus, TRP601 à doses supra-pharmacologiques n'a pas d'impact sur les fonctions du SNC (comportement, mémoire) et n'affecte pas la mort cellulaire programmée physiologique essentielle à la maturation du cerveau (Chauvier D. et al., 2011).

2. Optimisation

Les inhibiteurs Ac-VDVAD-CHO et Q-VDVAD-OPh ciblent la CASP-2 mais sont aussi des inhibiteurs efficaces de la CASP-3. Cependant, cette dernière a un rôle majeur dans le développement à l'échelle de l'organisme et plus précisément au niveau du cerveau. À l'âge adulte elle est également impliquée dans des processus neuronaux majeurs tels que le *pruning* axonal, la plasticité synaptique qui sont les bases de la formation de réseaux de neurones intègre. Il y a donc une nécessité à ne pas inhiber cette protéase.

Une approche de conception rationnelle basée sur l'étude comparative des sites actifs de ces deux enzymes a été réalisée par le Dr Maillard (fondation CHDI, USA) afin d'accroître la sélectivité des inhibiteurs en faveur de la CASP-2. La comparaison des sous-sites S1-S5 des sites actifs des CASP-2 et -3, a révélé que la différence entre les deux sites actifs résidait seulement dans la taille et la forme du sous-site de reconnaissance S2, où une Alanine est remplacée par une Tyrosine chez la CASP-3 (Figure 6). Il a donc été suggéré qu'un groupement

encombrant en P2 du motif VDVAD, pourrait être déterminant pour conférer une sélectivité vis-à-vis de la CASP-2 (Maillard M.C. *et al.*, 2011).

CONTEXTE ET OBJECTIFS

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Au-delà de ses rôles dans l'initiation de l'apoptose suite à divers stress cellulaires, la Caspase-2 (CASP-2) est impliquée dans de nombreux processus non apoptotiques, tels que : la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme et la régulation du stress oxydant. Elle peut, en fonction du contexte cellulaire, agir comme suppresseur de tumeur.

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative progressive dont les deux caractéristiques majeures sont (i) le dépôt de plaques amyloïdes, conséquences d'une agrégation de peptides β amyloïdes (A β) entre les neurones et (ii) la présence d'enchevêtrement de neurofibrilles, causées par l'hyperphosphorylation et la dégradation de la protéine Tau, dans les neurones.

Dans ce contexte, la CASP-2 agit à deux niveaux. D'une part elle est le médiateur de la synaptotoxicité induite par A β à des étapes précoces de la maladie. Cependant, elle coordonne également la toxicité induite par le peptide amyloïde, en agissant à des étapes précoces du processus de mort cellulaire. D'autre part, son clivage de la protéine Tau au niveau de l'Asp-314 entraînerait la translocation de cette dernière et serait la cause d'altérations synaptiques et de déficits cognitifs.

Ces éléments suggèrent que la CASP-2 pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, il est important de disposer d'agents pharmacologiques capables de l'inhiber spécifiquement.

La majorité des inhibiteurs de Caspases sont des tétra- ou penta-peptides synthétiques qui contiennent les séquences préférentiellement reconnues par les Caspases cibles. Ces molécules agissent donc en compétiteurs du substrats naturels *vis-à-vis* du site actif de l'enzyme. Cependant, la conservation structurale du site actif entre les différentes Caspases rend difficile le développement d'inhibiteurs sélectifs. Ainsi, le motif pentapeptidique VDVAD préférentiellement reconnu par la CASP-2 est également reconnu par la CASP-3. Néanmoins, la CASP-3 joue un rôle majeur au niveau du système nerveux central et plus précisément dans la physiologie du neurone au cours du développement et à l'âge adulte. À cela s'ajoute la concentration intracellulaire élevée en cette enzyme. Tous ces éléments suggèrent une réelle nécessité à développer des inhibiteurs sélectifs de la CASP-2.

Le travail de ces trois années de thèse a porté sur la conception/sélection, la caractérisation et la validation d'inhibiteurs avec un index de sélectivité optimisé en faveur de la CASP-2 *versus* la CASP-3. Le travail de thèse s'est organisé selon deux axes.

L'objectif du premier axe était d'identifier des inhibiteurs sélectifs et originaux de la CASP-2. Pour cela, trois stratégies d'identification ont été suivies :

- 1. Approche de conception rationnelle de peptides inhibiteurs ciblant le site actif
- 2. *Design* de peptides inhibiteurs de l'interface de dimérisation par des études *in silico*
- 3. Criblage aléatoire de petites molécules organiques à partir de chimiothèques aux *scaffolds* variés.

Pour les différentes approches, les molécules « touches » résultantes ont été évaluées *in vitro* par analyse des cinétiques enzymatiques à l'aide de tests robustes et miniaturisés (pouvoir inhibiteur et mécanismes d'inhibition). De plus, des modèles cellulaires standardisés avec des *readouts* associés à l'activité de la CASP-2 ont également été utilisés afin de valider ces inhibiteurs.

Le second axe de recherche de cette thèse visait à étudier le rôle de la CASP-2 dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Pour atteindre cet objectif, deux stratégies ont été employées :

- Validation des meilleurs candidats dans des modèles cellulaires innovants impliquant le peptide β-amyloïde.
- Une approche biochimique pour étudier le clivage de la protéine Tau par la Caspase-2 in vitro.

Ainsi, après les Matériels et Méthodes utilisés au cours de ces trois années, les résultats seront présentés au travers de quatre Parties.

- La première partie développe les résultats obtenus dans le cadre de la stratégie de peptides inhibiteurs du site actif. Cette partie est subdivisée en cinq Chapitres dédiés à :
 - L'étude des peptides inhibiteurs de première, seconde et troisième générations
 - Les caractérisations enzymologique et cellulaire des inhibiteurs des Caspases du groupe II
 - L'étude des premiers inhibiteurs sélectifs de la Caspase-2

- La seconde partie retrace les résultats obtenus dans le cadre de l'étude du rôle de la Caspase-2 dans des modèles cellulaires, notamment microfluidiques, de la maladie d'Alzheimer.
- La troisième partie présente les résultats obtenus pour les deux autres stratégies d'identification d'inhibiteurs :
 - Peptides de l'interface de dimérisation par approche in silico
 - Petites molécules organiques
- L'ultime partie des Résultats propose une synthèse des travaux annexes réalisés au cours de la thèse et qui ont fait l'objet de publications.

Les résultats seront ensuite repris dans une Discussion.

Enfin, une conclusion générale sur les résultats obtenus ainsi que sur les perspectives qu'ils ouvrent sera abordée en fin de ce manuscrit.

I. Enzymologie mécanistique

A. Matériels

1. Enzymes recombinantes et substrats fluorogènes

Les Caspases-2 (CASP-2) et -3 (CASP-3) humaines recombinantes et actives sont commercialisées et fournies respectivement par les sociétés Enzo Life[®] et R&D Systems[®]. La CASP-2 est reçue en poudre puis resuspendue à 1 U/µL dans du PBS (Sigma[®]) ; 15% glycérol (v/v). La CASP-3 est reçue solubilisée dans du PBS à 10 µg/40µL. Les peptides substrats EnzoLife[®] utilisés pour les mesures d'activités enzymatiques, Ac-DEVD-AMC et Ac-VDVAD-AMC sont dissous à 20 mM dans du DMSO et stockés à -20°C à l'abri de la lumière. Ces substrats sont porteurs à leurs extrémités, de groupements protecteurs inertes (Boc ou Suc) en N-ter et fluorogènes greffés en C-ter, le 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC). La libération de l'AMC permet de suivre l'activité enzymatique en unité de fluorescence (RFU) au cours du temps. Les mélanges réactionnels (100 µl) sont déposés dans des plaques noires 96 puits (COSTAR3915) pour les mesures de fluorescence.

En plus des CASP-2 et -3, d'autres protéases ont été utilisées. Les kallikréines 1, 6 et 8 humaines sont achetées auprès de la société R&D Systems[®]. Les plasmine, trypsine, thrombine, humaines ont été achetées, sous leur forme active auprès de Sigma-Aldrich[®]. La pro-hK1 est activée par la Thermolysine (R&D Systems[®]) après une incubation de 1 heure dans le tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 0,05% pH 7,5 puis la réaction est stoppée par ajout de d'EDTA 50 mM. Les pro-hK6 et 8 (R&D Systems[®]) sont activées par la Lysyl-endopeptidase (Wako-BioProducts[®]) selon le protocole suivant : 100 µg/mL d'enzyme sont incubés avec 0,2 µg/mL de Lysyl-endopeptidase dans du tampon Tris 50 mM, Brij-35 0,05% ; pH 8 pendant une heure à 37°C puis la réaction est stoppée par dilution comme préconisé par le fournisseur. Toutes ces protéases sont diluées à 4 µM (1 U/mL pour la thrombine) dans le tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 0,05% pH 8. Les Cathepsines actives humaines ont été commandées auprès de EnzoLife[®]. Les Cathepsines B (16,6 µM) et L (11,9 µM) sont isolées et purifiées à partir de foie humain est sont formulées en liquide dans un tampon sodium acétate 50 mM, EDTA 1mM, pH 5,0. La Cathepsine D également isolée et purifiée à partir de foie humain est livrée sous forme lyophilisée est reconstituée à 1 µg/mL

(19 μ M) dans de l'eau milliQ. La CASP-6 humaine, recombinante, active est fournie par EnzoLife[®] et est solubilisée selon le même protocole que la CASP-2 à une concentration stock de 2,2 μ M.

Les substrats fluorogènes Boc-QAR-AMC et Boc-VPR-AMC ont été achetés auprès de l'entreprise Bachem[®]. Les substrats pour Ac-VEID-AMC, z-RR-AMC, RLR-AMC et le substrat FRET Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH₂, pour le suivi de l'activité Cathepsine D, ont été fournis par EnzoLife[®].

2. Molécules étudiées au cours de la thèse

Les inhibiteurs réversibles dérivés de l'Ac-VDVAD-CHO variant en P₂ : c33, h33, k33 et q33 ont été fournis par la fondation CHDI, USA (Collaboration avec le Dr Maillard). Les inhibiteurs pentapeptides irréversibles TRP601(Q-V(OMe)DVAD(OMe)-OPh), Δ2MeTRP601 (Q-VDVAD-OPh), ont été conçu et développés initialement par la société Theraptosis S.A. (Chauvier et al., 2011) puis obtenus auprès de Chiesi Pharmaceuticals. Le TRP901 (Q-DEVD(OMe)-OPh) et LJ2 ont été synthétisés à façon par la société Polypeptides. Les composés Ac-DEVD-CHO et Ac-VDVAD-CHO sont commercialisés par la société Sigma-Aldrich[®]. Le Q-VD-OPh et Q-VE-OPh sont achetés auprès de MP Biomedical[®]. La série des composés de la nouvelle série LJ, LJ2A-2B; LJ3A-3B; LJ4A-4B et LJ5A-5B ont été synthétisés à façon par Bachem[®]. Les inhibiteurs large spectres z-VAD(Ome)-fmk, z-VAD-fmk et z-VDVAD-fmk sont fournis par MP Biomedical[®].. Enfin, le composé peptidomimétique Emricasan est commandé auprès de la société Medkoo Biosciences[®]. Toutes les petites molécules organiques testées au cours de la thèse sont issues de chimiothèques du laboratoire. Excepté la série de Triazoles synthétisée par Anthony Nina Diogo de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR 8232 ainsi que la Piperlongumines et ses dérivés qui ont été synthétisées par l'équipe de Vanderlan da Silva Bolzani du département de Chimie organique de l'Institut de Chimie de l'Université UNESP, São Polo au Brésil. Tous les stocks de molécules sont conservés en poudre à -20°C et les solutions de travail sont solubilisés à 10 mM dans du DMSO et conservées à -80°C. Des solutions intermédiaires à des concentrations plus faibles sont préparées extemporanément pour les analyses mécanistiques et ne sont pas conservées à l'issue des expériences.

3. Autres réactifs

Le DMSO, l'hydroxylamine, le succinate de sodium, la BSA, le CHAPS, l'EDTA, le Tris, le Brij-35 et le 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) ont été fournis par la firme Sigma-Aldrich[®]. Les sources des réactifs utilisés en culture cellulaire sont indiquées plus loin.

4. Appareils

Les valeurs de fluorescence des activités enzymatiques et l'analyse de la cytotoxicité au XTT sont mesurées à 37°C, à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de microplaques, BMG FLUOstar OPTIMA. Cet appareil est piloté par le logiciel Biolise[®] et est équipé d'un dispositif de refroidissement thermoélectrique par effet Peltier. Les traitements mathématiques et statistiques des données cinétiques sont effectués à l'aide du logiciel Kaleidagraph[®].

Les mesures de pH des tampons ont été réalisées à l'aide d'un instrument METTLER TOLEDO SevenCompactTM muni d'un senseur thermique et d'un support de calibration.

B. Cinétique enzymatique

Tous les tests sont réalisés en duplicata ; de plus, afin de ne pas impacter l'efficacité catalytique des enzymes le pourcentage de DMSO ne doit pas excéder 4 % dans le mélange réactionnel. Les molécules étant solubilisées dans ce solvant, tous les contrôles sont réalisés en présence de celui-ci. Enfin, les concentrations en enzymes et en substrats déterminées pour des conditions expérimentales optimales ont été conservées pour chaque expérience effectuée au cours de la thèse.

1. Conditions expérimentales

L'évaluation des inhibiteurs sur les CASP-2 et -3 est réalisée dans des conditions de cinétique enzymatique propres à chaque enzyme mises au point au préalable (**Table 8**), avec des concentrations fixes en substrat et en enzyme. Le rapport k_{cat}/K_M rend compte de l'efficacité catalytique, où k_{cat} (s⁻¹) est la constante catalytique ou nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par chaque site actif quand l'enzyme est saturée et K_M est la constante de Michaelis-Menten qui rend compte de l'affinité enzyme-substrat, elle représente la concentration en substrat pour une vitesse égale à la Vitesse maximale de réaction (V_{max}) divisée par 2.

Pour les tests enzymatiques, l'enzyme est incubée avec l'inhibiteur ou le DMSO (contrôle négatif) dans un volume défini de tampon, adapté à l'enzyme et à la formation du

complexe de Michaelis-Menten, pendant 30 min à 37°C. La réaction est déclenchée, dans un volume total de 100 µl, lors de l'ajout du mélange tampon-substrat ; l'activité enzymatique est alors mesurée sur 20 minutes. La libération du groupe fluorescent AMC est détectée en utilisant les longueurs d'ondes suivantes : λ_{ex} = 360 nm pour l'excitation et λ_{em} = 460 nm pour la mesure de l'émission. L'hydrolyse du substrat FRET de la Cathepsine D est suivie en utilisant les longueurs d'ondes suivantes : λ_{ex} = 320 nm pour l'excitation et λ_{em} = 405 nm pour la mesure de l'émission.

Enzymes	Substrats AMC	Tampons	Км	k _{cat}	k _{cat} /K _M
	(P5/P4))- P1)		(μM)	(s-1)	(M ⁻¹ .s ⁻¹)
Caspase-2	Ac-VDVAD-↓-AMC	20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2	29	13,6	1.10 ⁶
(0,2 nM)	(25 μM)	mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800			
(62 kDa)		mM Succinate			
Caspase-3	Ac-DEVD-↓-AMC	20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2	12,3	7,3	593 000
(0 <i>,</i> 1nM)	(10 μM)	mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1			
(60 kDa)		mg/mL de BSA			

Table 8. Conditions de cinétique enzymatique optimales pour les Caspases-2 et -3

L'activité enzymatique est caractérisée par les valeurs de vitesses initiales (Vi) qui sont définies à partir de Michaelis-Menten, (**éq. 1**), où V_{max} est la vitesse pour laquelle l'enzyme est saturée en substrat, [S] est la concentration en substrat. La vitesse initiale, ici exprimée en unité arbitraire de fluorescence (RFU) par minute, est obtenue expérimentalement à partir de la valeur de la pente, sur la portion linéaire de la représentation : f (temps) = RFU, valeur calculée directement par le logiciel Biolise[®].

$Vi = V_{max} x [S] / (Km + [S])$ (éq. 1)

La vitesse initiale obtenue pour le témoin (V₀) est considérée comme 100 % de l'activité enzymatique. Aussi, une inhibition se caractérise par une activité après traitement, avec l'inhibiteur, inférieure à 100%. Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de l'**équation 2**, où V₀ est la vitesse initiale du contrôle négatif, V_i la vitesse initiale en présence de l'inhibiteur.

% Inhibition = $(1 - (V_0 / V_i)) \times 100$ (éq. 2)

Les études de sélectivité ont été effectuées sur des protéases à Cystéine et Sérine concurrentes. Pour cela, les molécules d'intérêt sont incubées pendant 30 minutes avec l'inhibiteur à 37° C dans les conditions décrites dans la **Table 9**. Les valeurs des K_M sont indiquées pour les enzymes pour lesquelles des mécanismes d'inhibition ont été étudiés. Au

même titre que pour les CASP-2 et -3, les mécanismes d'inhibition des molécules inhibitrices

de ces enzymes concurrentes sont étudiés comme décrits dans les sections suivantes.

Enzymes	Substrats	Tampons
Caspase-6	Ac-VEID-AMC	20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM
(50 nM)	25 μΜ	EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1 mg/mL de
()	(K _M = 149, 69 μM)	BSA
Cathepsine B	z-RR-AMC	Acétate de sodium 0,1 M;
(0,2 nM)	20 μΜ	EDTA 1mM ; DTT 2mM ; Brij-35
	(K _M = 169,8 μM)	0,01 % ; pH 5,5
Cathepsine L	RLR-AMC	Acétate de sodium 0,1 M;
(1,2 nM)	25 μΜ	EDTA 1mM ; DTT 2mM ; Brij-35
	(K _M = 13,8 μM)	0,01 % ; pH 5,5
Cathepsine D	Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-	Citrate de Sodium 0,1 M;
(0,1 nM)	Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-	EDTA 2 mM ; Brij-35 0,01% ; pH
	NH ₂	4
	10 μM	
hK1 (4 nM)	Boc-VPR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100μΜ	0,05% ; pH 7
hK6 : 2 nM	Boc-QAR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100 μΜ	0,05% ; pH 7
hK8 (1 nM)	Boc-VPR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100μΜ	0,05% ; pH 7
Thrombine (10 mU/mL)	Boc-VPR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100μΜ	0,05% ; pH 7
Plasmine (4 nM)	Boc-QAR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100μΜ	0,05% ; pH 7
Trypsine : 0,1 nM	Boc-QAR-AMC	Tris 50 mM ; Citrate 1 M ; Brij-35
	100μΜ	0,05% ; pH 7

Table 9. Conditions de mesure de cinétiques enzymatiques des protéases concurrente dans le
cadre de l'étude de la sélectivité.

Le critère de sélection qui a été retenu pour la sélection d'une molécule comme inhibiteur est que le pourcentage d'inhibition du composé à 10 μ M doit être supérieur à 50 %.

2. Détermination de l'IC₅₀

Une étape préliminaire dans la caractérisation d'un inhibiteur est la détermination de son IC_{50} . Ce paramètre est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer l'activité enzymatique de 50 % de sa valeur maximale, non inhibée. Pour cela, le composé, à différentes concentrations, est incubé avec l'enzyme et le tampon pendant 30 minutes à 37°C, pour permettre la formation du complexe Enzyme-Inhibiteur. La réaction est ensuite déclenchée par ajout du substrat, puis l'activité est mesurée sur 30 minutes pour la détermination des vitesses initiales. L'effet inhibiteur du composé étudié (en %) en fonction de sa concentration
suit généralement l'**équation 3** qui traduit une hyperbole. L'équation est entrée dans le logiciel Kaleidagraph[®], pour l'ajustement de la courbe f ([I]) = % Inhibition, où [I] est la concentration en inhibiteur, l'IC₅₀ est alors obtenue.

% Inhibition = 100 x [I] / (IC₅₀+ [I]) (éq. 3)

C. Étude du mécanisme d'inhibition

1. Réversibilité de l'effet inhibiteur par la méthode de dilution

La réversibilité de l'inhibition est étudiée par la méthode de dilution. L'enzyme et l'inhibiteur (ou le DMSO) sont incubés 30 minutes à 37°C. Le complexe ainsi formé est dilué au 100^e dans le mélange tampon/substrat puis la mesure de l'activité est lancée sur 1 heure. La vitesse initiale obtenue pour le contrôle DMSO représente les 100 % d'activité et servira de référence pour la quantification de l'activité résiduelle de l'enzyme en présence de l'inhibiteur. La concentration de l'inhibiteur est choisie, à partir des courbes IC₅₀, de manière à ce que l'enzyme soit inhibée à plus de 90 % avant dilution et à moins de 10 % après dilution, pour être sûr que l'effet après dilution ne soit pas dû à un effet de l'inhibiteur sur l'enzyme.

2. Inhibition réversible – méthode de Compétitivité

Afin de caractériser les inhibiteurs réversibles, les constantes de dissociation Ki et Ki' sont déterminées. Ces dernières rendent respectivement compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme seule ou pour l'enzyme complexée au substrat. Pour cela, l'inhibiteur est mis en compétition avec le substrat vis-à-vis du site actif de l'enzyme. Si, après dilution, l'activité est restaurée à environ 50 %, l'inhibiteur est dit « réversible ».

Le composé, à différentes concentrations ($1/4 \ IC_{50}$; $1/2 \ IC_{50}$; $2 \ IC_{50}$; $4 \ IC_{50}$) est incubé avec l'enzyme pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est lancée sur 1 heure dès l'ajout du substrat. Il existe différents mécanismes d'inhibition réversible. Pour confirmer le mécanisme et les paramètres d'inhibition Ki et Ki', le tracé en double inverse de Lineweaver-Burk est employé. Pour cela, l'évolution du rapport 1/Vi en fonction de 1/[S] est traité à partir de l'**équation 4** où V_{max}^{app} et K_M^{app} sont les paramètres qui varient en fonction du type d'inhibition et en fonction de la concentration en inhibiteur. L'intersection des droites obtenues pour des concentrations croissantes en inhibiteurs permet de distinguer les différents types d'inhibiteurs.

$$\frac{1}{V} = \frac{Kmapp}{Vmax app} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmaxapp} \qquad (éq. 4)$$

Ensuite, un graphique secondaire, obtenu à partir des valeurs des pentes du tracé Lineweaver-Burk en fonction de la concentration en inhibiteur, permet d'obtenir la valeur de Ki. Sa valeur est donnée par le point d'abscisse à l'origine. Pour la détermination de Ki' est expliquée plus loin. Il est à noter que pour les inhibiteurs où les tracés Lineweaver-Burk ne permettent pas de conclure quant aux mécanismes d'inhibition, la représentation graphique de Dixon a été employée. Ce type de graphique, contrairement à la représentation en double inverses, permet d'obtenir directement les valeurs des constantes d'inhibition.

Pour un inhibiteur réversible, la fixation à l'enzyme est indépendante du temps et suit le schéma réactionnel *ci-dessous*.



À partir de ce schéma réactionnel, les équations suivantes peuvent être établies :

$$IC_{50} = \frac{K_{I} * K_{I}' * (K_{m} + [S])}{K_{I}' * Km + K_{I} * [S]}$$
 (éq.5)
$$\frac{1}{V} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_{I}'}}{V_{max}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{I}}\right) * K_{m}}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$$
 (éq.6)

1) Lorsque $K_1' \rightarrow \infty$, l'inhibiteur est compétitif *vis-à-vis* du substrat, c'est-à dire qu'il est en compétition du substrat pour la fixation au site actif de l'enzyme. Les équations 5 et 6 sont simplifiées, l'équation 7 concerne la représentation de Dixon.

$$IC_{50} = K_{I} * \left(1 + \frac{[S]}{K_{m}}\right)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{I}}\right) * K_{m}}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V_{max}} \times \frac{1}{[S] \times Ki} [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{Km}{[S]}\right) \text{ (éq. 7)}$$



2) Lorsque $K_1 \rightarrow \infty$, l'inhibiteur est dit incompétitif et ne se lie qu'au complexe Enzyme/Substrat. Les équations 5 et 6 et 7 sont simplifiées :



3) Lorsque KI = KI', l'inhibiteur est non-compétitif et se fixe avec la même affinité à l'enzyme seule et au complexe Enzyme/Substrat. Les équations 5 et 6 sont simplifiées :

 $IC_{50} = K_I$

$$\frac{1}{V} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{max}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) * K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max} \times K_i} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$



4) Lorsque $K_l \neq K_l'$, l'inhibiteur est mixte, c'est-à dire qu'il se fixe avec une affinité différente à l'enzyme seule et au complexe enzyme/Substrat.



Pour la confirmation de K_1 , on utilise les graphiques secondaires de Lineweaver-Burk :



3. Inhibiteurs covalents

3.1. Mise en évidence

Il existe deux types d'inhibiteurs covalents, ceux qui établissent un lien transitoire avec l'un des résidus catalytiques et ceux qui se fixent de manière à inhiber l'enzyme de manière permanente. Pour déterminer le mécanisme d'inhibition, on utilise l'hydroxylamine, NH₂OH, à 500 μ M à pH 8. Cette molécule agit en puissant nucléophile et permet de lever l'inhibition pour les inhibiteurs qui établissent un lien covalent transitoire. Ce test est utilisé lorsqu'à l'issue de la méthode de dilution, on n'observe peu ou pas de restitution de l'activité enzymatique.

L'enzyme et l'inhibiteur (ou le DMSO) sont incubés 30 minutes à 37°C. Le complexe E-I, ainsi formé est ensuite dilué au 100^{e} par ajout du mélange tampon-substrat contenant le NH₂OH (0,5 M). L'activité enzymatique est mesurée sur 1 heure. La vitesse initiale obtenue avec le témoin DMSO est utilisée comme référence pour la détermination des activités résiduelles des enzymes en présence des inhibiteurs. Les concentrations en inhibiteur sont choisies selon les mêmes critères que pour la méthode de dilution.

3.2. Quantification des paramètres cinétiques

L'efficacité inhibitrice pour les inhibiteurs irréversibles est donnée par le rapport k_{inact}/K_{I} , où k_{inact} est la constante de vitesse maximale d'inactivation et K_{I} est la concentration de l'inhibiteur correspondant à la moitié de la vitesse maximale d'inactivation, c'est une constante de dissociation qui rend compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Pour les inhibiteurs où l'activité enzymatique n'est pas restituée à l'issue du traitement à l'hydroxylamine, l'inhibition suit le chemin réactionnel suivant, où E*I représente une « chimère cinétique » entre les espèces E-I (acyl-enzyme) et EI (enzyme inactivée) :

$$E + I \longleftrightarrow E^{*I} \longrightarrow E^{*}$$

Pour quantifier l'inhibition deux types de méthodes sont employées. Toutefois, pour les inhibiteurs très efficace la méthode Continue a été privilégiée.

3.2.1. Détermination des paramètres cinétique par la méthode dite Discontinue ou de prélèvements

L'enzyme est incubée en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs à 37°C. Au cours du temps, des aliquotes (1 µl) sont prélevés et l'activité enzymatique est mesurée après dilution dans un grand volume de tampon (99 µl). Un témoin est réalisé en incubant l'enzyme avec du DMSO. L'**équation 8**, où le rapport de la vitesse initiale en présence de l'inhibiteur, V_i, sur la vitesse initiale du contrôle DMSO, V₀, traduit le pourcentage d'activité résiduelle. La représentation graphique f (temps) = ln (% d'activité résiduelle) permet, à partir des pentes, d'obtenir les valeurs des constantes de vitesses d'inactivation (k_{obs}) pour chaque concentration en inhibiteur (**Figure 49A**). L'**équation 9**, permet de relier le k_{obs} aux paramètres k_{inact} et K₁ (**Figure 49B**). L'ajustement de la courbe f ([I]) = k_{obs} en hyperbole est fait à l'aide de cette équation avec le logiciel Kaleidagraph. Les rapports k_{inact}/K₁ où k_{inact} sont alors obtenus.



Figure 49. Représentations graphiques utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques par la méthode discontinue.

(A) Détermination des valeurs de k_{obs} pour chaque concentration d'inhibiteur donnée. (B) Représentation de k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur pour la détermination des paramètres k_{inact} et K_{I} .

3.2.2. Détermination du rapport k_{inact}/K_I par la méthode Continue ou Méthode de Compétition

Lorsque l'inactivation est trop rapide pour être évaluée par la méthode des prélèvements, le phénomène d'inactivation est ralenti en introduisant le substrat (Reboud-Ravaux M. *et al.,* 1999). Contrairement à la compétitivité, les cinétiques sont mesurées avec une concentration fixe de substrat. Dans ces conditions, le substrat et l'inhibiteur, à

différentes concentrations, sont mis en solution dans le tampon et la réaction est déclenchée par ajout d'enzyme. L'analyse mathématique pour la cinétique est résolue par l'**équation 10** :

$$V_i = v_0 * e^{-\Pi * t}$$
 (éq. 10)

Où, V_i est la vitesse au temps t, V₀ est la vitesse au départ (t=0) pour une concentration d'inhibiteur donnée (**Figure 50A**).

Comme :

$$Produit = \int_0^t v_i \cdot dt$$

Alors :

$$F.U = \int_0^t v_i \cdot dt + F.U_0 = \frac{-v_0 * e^{-\pi * t} + v_0}{\pi} + F.U_0$$

Où :

$$\pi = \frac{k_i * [I]'}{K_I + [I]'}$$

Il est à noter que l'on ne considère par la concentration en inhibiteur définie au départ mais la concentration réelle dans le puits. En effet, la mise en compétition avec le substrat modifie cette concentration. La concentration réelle en inhibiteur est alors donnée par le rapport (**Figure 50B**) :

$$[I]' = \frac{[I]}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

(F.U = unités arbitraires de fluorescence correspondant à l'apparition du produit, $F.U_0$: fluorescence à t=0).



Figure 50. Représentations graphiques types pour la détermination des paramètres cinétiques par la méthode continue.

(A) Détermination des valeurs de π pour chaque concentration d'inhibiteur donnée. (B) Détermination des paramètres k_{inact} et K_I.

II. Évaluation des inhibiteurs sur des modèles cellulaires d'apoptose et d'inflammation

A. Modèle cellulaire standardisé d'apoptose

1. Culture des cellules HeLa

Les cellules de la lignée cellulaire HeLa (cellules humaines adhérentes, provenant d'une tumeur du col utérin, ATCC) sont cultivées dans un milieu contenant du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, High Glucose, GlutaMAX[™], Pyruvate) fournit par Gibco-Life technologies[®]. Le milieu est complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco, Life technologies) préalablement décomplémenté et filtré, ainsi qu'avec 1% de mélange de Pénicilline (100units/mL), Streptomycine (100µg/mL) (Pen Strep, Gibco Life Technologies). L'entretien routinier des cellules est réalisé selon les recommandations d'ATCC (1.10⁶ cellules par flasque T75 à l'ensemencement). Les cultures sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Lorsque les cellules atteignent 70-80% de confluence (≈ 9.10⁶ cellules), elles sont lavées au PBS (150 mM NaCl ; 100 mM PO42- ; pH. 7) puis traitées à la Trypsine-0,05% EDTA (Gibco, Life Technologies). Après l'inhibition de la trypsine par ajout de SVF, la suspension cellulaire est centrifugée à 700 rpm pendant 5 minutes. Après comptage sur cellule de Malassez, les cellules sont ensemencées dans de nouvelles flasques à 1.10⁶ ou dans des plaques 24 puits en vue des traitements avec les agents pharmacologiques.

2. Principe

Les inhibiteurs sont évalués sur un modèle d'apoptose. Pour cela, les cellules HeLa sont traitées avec la Vincristine (Sigma Aldrich[®]) ; solubilisée dans de l'eau à 5mM), un alcaloïde issu de la pervenche de Madagascar, utilisé comme traitement anticancéreux. Cet agent, se lie à la tubuline et empêche la polymérisation des microtubules, conduisant alors au blocage de la mitose et/ou à l'apoptose de manière Caspase-dépendante.

Les paramètres de mort cellulaire sont évalués par cytométrie en flux. Cette technique permet de mesurer et d'analyser les caractéristiques morphologiques d'une cellule, et de quantifier la fluorescence associée à l'ajout de sondes dans la cellule. Cette technologie utilise 3 systèmes, un système fluidique qui transporte les cellules dans un canal ou les cellules vont être frappées par un faisceau laser. Un système optique constitué de laser et de filtres

optiques qui vont récupérer les signaux pour les rediriger vers un détecteur approprié. Enfin, un système électronique, qui convertit le signal électronique en un signal lumineux.

Au cours de l'apoptose, en absence de phagocytes, une nécrose secondaire entraîne la perméabilisation des membranes. Cette nécrose est évaluée grâce à l'iodure de propidium (IP, Sigma Aldrich®). Ce dernier est une sonde fluorescente ayant une forte affinité pour les acides nucléiques et va donc pénétrer dans les cellules si et seulement si la membrane plasmique est altérée.

3. Traitement et Conditions de marquage

24h avant les traitements pharmacologiques et/ou inductions de mort cellulaire, les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 27 000 cellules/puits. Les cellules sont ensuite prétraitées avec les inhibiteurs à différentes concentrations (3, 10, 30 et 60 μ M) pendant 45 minutes. La mort cellulaire est ensuite induite par ajout de la Vincristine. Les conditions d'induction de mort avec la vincristine (dose et durée d'induction) sont déterminées au préalable en utilisant des gammes de concentrations croissante : 5, 10, 20 et 50 nM de Vincristine, testé sur 12 ; 24 ; 36 heures.

4. Quantification des effets cellulaires

Les résultats sont analysés par cytométrie en flux. Le contenu de chaque puits, qui inclus les surnageants et les produits du traitement par la Trypsine, est collecté puis mélangé à du PBS. Le mélange est ensuite centrifugé à 900 rpm pendant 5 minutes et les culots sont ensuite repris dans 300 µL de milieu contenant de l'iodure de propidium (2µg/mL pendant 10 min à 37°C) (Life technologies).

Les cellules sont analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un appareil MACSQuant[®] VYB (Miltenyi Biotec[®], Bergisch Gladbach, Germany) avec une excitation à 561 nm sur le canal Y2. Pour chaque échantillon, les propriétés optiques d'environ 5000 cellules ont été mesurées, puis analysées à l'aide du logiciel Macsquantify (Miltenyi Biotec[®]). L'analyse inclut les paramètres FSC et SSC (FSC = Forward Scatter qui est relié à la taille de la cellule, SSC = Side Scatter, lié à la granulosité, la complexité d'une particule).

B. Modèle inflammatoire

1. Cultures des lignées THP-1

Les cellules THP-1 sont issues d'un enfant de 1 an atteint d'une leucémie. C'est une lignée pré-monocytaire, caractérisée par une suspension des cellules (non adhérentes) avec une forme bien arrondies. Les cellules utilisées proviennent de la société ATCC[®]. Les cellules sont cultivées à une densité de 0,4.10⁶/mL dans des flasques T75 maintenue droites dans un milieu RPMI 1640 Medium, Glutamax, Supplement HEPES (ThermoFischer Scientific, #72400027) complété avec 10 % de SVF (préalablement décomplémenté et flitré) et 1% d'antibiotiques PS. Les cultures sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

2. Différenciation des cellules

La différenciation des THP-1 est induite par ajout de phorbol 12-myritate 13-acétate (PMA, 5 mg/mL stock dans du DMSO, InvivoGen, #tlrl-pma) dans le milieu. Plus précisément, ce dernier mime la structure du diacylglycérol (DAG) qui est un activateur de la protéine Kinase C (PKC). Ainsi, il permet la stimulation de l'expression de facteurs de transcriptions dont NF- κ B, qui sont impliqués dans la différenciation en macrophage (Park E.K. et al., 2007 ; Daigneault M. et al., 2010). Après traitement avec le PMA les cellules acquièrent un phénotype macrophageslike, c'est-à dire qu'elles deviennent adhérentes et ne se divisent plus. En pratique, les cellules sont ensemencées sur des plaques 24 puits à une densité de 300.10³ cellules/puits, le PMA est ensuite ajouté pendant 24h à une concentration de 50 nM. Le lendemain, les cellules sont lavées délicatement avec du PBS et du milieu complet frais est ajouté, les cellules sont alors laissées 3 jours. Le jour du traitement les cellules sont lavées avec du PBS et mises en présence ou non de 1 μg/mL de Lipopolysaccharide-EK Ultrapure – LPS- (Stock 1 mg/mL dans de l'eau ultrapure, InvivoGen, #tlrl-peklps) pendant 6 heures. Le LPS permet d'activer les macrophages via l'inflammasome NLRP3, plateforme d'activation de la CASP-1. Cette dernière permet alors le clivage de pro-IL1 β en IL1 β dans le milieu. A l'issue du traitement avec le LPS, le milieu est retiré et les cellules sont mise en présence ou non d'agents pharmacologiques pendant 1 heure. Ensuite, la nigéricine à 5, 10 et 20 µM est ajoutée pendant 30, 60, et 120 minutes. Cette dernière est un antibiotique qui entraîne la sortie d'ions K⁺ de la cellule pour accroître l'activation de NLRP3 pour « booster » le système.

3. Étude de l'inflammation et de la mort cellulaire

Á l'issue du traitement, les surnageants sont récupérés en vue des dosages de la cytokine IL1β par ELISA (Human IL-1β ELISA MAX[™] Deluxe, Biolegend, # 437005). De plus, une fois le surnageant récupéré, les cellules sont marquées avec du Hoescht 33342 (2 µg/mL) et de l'iodure de propidium (1 µg/mL) afin d'évaluer la cytotoxicité du traitement sur les cellules. Les deux agents sont ajoutés respectivement 10 et 5 minutes avant la prise de photo.

III. Étude du clivage de la protéine Tau humaine recombinante

Le clivage de la protéine Tau-441 humaine recombinante (Sigma, #T0576) par les CASP-2 et -3 est étudié par SDS-PAGE. Pour cela, des gels pré-coulés (CriterionTM TGXTM, 15 puits, 30 µL, 4-15%) de la société BIO-RAD ont été utilisés dans un dispositif BIO-RAD. Dans un premier temps, les CASP-2 et -3 (0,5 µg) sont mises en présence d'un inhibiteur à 100 µM, ou de DMSO, pendant 20 min à 37°C dans les tampons d'activités respectifs de ces enzymes. Toutefois, afin de ne pas perturber la migration le succinate de sodium n'est pas ajouté au tampon d'activité CASP-2. Ensuite, 5 µg de Tau-441 sont ajoutés dans les tubes d'intérêt contenant les enzymes en présence ou non de l'inhibiteur. Les échantillons sont ensuite incubés 2 heures à 37°C pour permettre le clivage. Ensuite, les produits de l'hydrolyse sont mélangés à un tampon Laemmli 5X (3.6% Tris, 40% glycérol, 8% SDS, 7.5% DTT, 0.5% bleu de bromophénol (BIO-RAD), pH 6.8) et chauffés à 95°C pendant 5 min. 25 µL de chaque échantillon sont déposés par puits ainsi que 10 μL de marqueur de poids moléculaire (Protein Marker Range 2-212 kDa ; BioLabs). La migration est réalisée dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1% à 110 volt pendant 1h. Les gels sont ensuite lavés 2 fois puis colorés, sous agitation, pendant 1 heure au Bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie R-250 0,025 % (p/v), méthanol 40 % (v/v) acide acétique 7 % (v/v)) afin de révéler les protéines présentes. Les expériences ont été réalisées deux fois.

Une autre technique, alternative au nitrate d'argent, été employée afin d'obtenir une meilleure résolution du clivage. Les réactifs ont été fourni par la Start'up OxiProteomics. Pour cela, après migration, le gel est placé dans un contenant avec une solution de 50 % éthanol (v/v), 50 % acide acétique (v/v) et placé sous agitateur orbital pendant 30 minutes. L'opération est répétée une fois avec de la solution fraîche. Le gel est ensuite mis en contact du marqueur SYPRO[®] Ruby (ThermoFischer Scientific, #S12000), sur toute la nuit sur mélangeur orbital. Le lendemain, le gel est transféré dans un nouveau contenant et lavé pendant 30 minutes dans une solution 10 % éthanol (v/v), 7 % acide acétique (v/v). Avant la lecture du gel, celui-ci est rincé dans de l'eau milliQ. Le gel est ensuite lu sur un lecteur Ettan dige GE healthcare® et les clichés obtenus sont traités sur Image J.

IV.Modèle intégré de la maladie d'Alzheimer

A. Dispositifs microfluidiques

1. Présentation des modèles utilisés

Au cours de la thèse, deux types de dispositifs microfluidiques ont été utilisés. Les puces 8C, sur lesquelles on retrouve 8 chambres isolées qui permettent la culture d'un type de neurones (Figure 51A) et les puces dites « 2C15 » qui permettent notamment la reconstruction de réseaux de neurones Cortex/Hippocampe fonctionnels (Figure 51B) (Peyrin J.M. et al., 2011). Ces dernières sont composées de 4 circuits où chacun d'entre eux est formé par l'association de deux chambres de 4 mm de long pour 1 mm de large, reliées entre elles par des microcanaux asymétriques de 500 µm. La chambre de gauche est appelée chambre « proximale » et la chambre de droite est appelée chambre « distale ». Les micro-canaux au départ de la chambre proximale ont un diamètre de 15 µm tandis qu'à l'arrivée de la chambre distale ces derniers ont un diamètre de 3 µm. Cette forme en entonnoir du microcanal permet le passage unidirectionnel de 8 à 10 axones corticaux provenant de la chambre proximale vers la chambre distale (Figure 51C). Chaque chambre est rendue accessible à l'expérimentateur via des puits ou réservoirs, de 3 à 4 mm de diamètre, formés manuellement aux extrémités de chaque chambre. Ainsi ces derniers permettent de relier les chambres à la surface de la puce microfluidique. Le volume de chaque puits est d'environ 70 µL tandis que le volume d'une chambre est de 300 nl. Au niveau de des circuits, le renouvellement du milieu est assuré par l'écoulement généré lors du remplissage des réservoirs et les échanges gazeux essentiels à la survie des neurones sont permis grâce à la porosité du polymère Poly-Diméthylsiloxane ou PDMS qui compose la puce.





(A) Dispositifs 8c, ces puces sont caractérisées par la présence de 8 chambres individuelles dans lesquelles les neurones de l'hippocampes sont ensemencés à une densité de 15.10^6 /mL. (B) Représentation d'une puce 2c15 avec 4 circuits. Permettant de cultiver des réseaux de neurones. (C) Détails sur la construction d'un circuit. Chaque circuit se compose de deux chambres isolée fluidiquement par l'existence d'un différentiel de pression. Ces deux chambres sont reliées entre elles par des micro-canaux asymétriques de 500 μ M de longueur. Cette forme en entonnoir du micro-canal permet l'orientation de la projection des axones des neurones de la chambre de gauche, dit proximale, vers la chambre de droite, appelée chambre distale. Dans nos expériences, les neurones de l'hippocampe sont ensemencés dans la chambre distale (10.10⁶/mL) tandis que les neurones de l'hippocampe sont ensemencés dans la chambre distale (10.10⁶/mL). L'accès aux chambres par l'expérimentateur est permis grâce à la présence de réservoirs, ou puits, qui relient les chambres à la surface du PDMS.

2. Fabrication des puces microfluidiques

Les étapes du processus de fabrication des puces sont illustrées en **Figure 52**. Les puces 8C et 2c15 sont obtenues à partir de moules en résines différents au fond desquels les empreintes en reliefs des 4 ou 8 circuits propres à chaque dispositif sont présents. Les moules en résines utilisés pour la fabrication des puces 2c15 sont des modèles SU-8 optimisés au plan de leur dimensions dans le cadre d'un travail collaboratif avec la société MicroBrain BT. Dans les deux cas, les puces sont fabriquées à partir d'un mélange de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) et de 10 % de réticulant (Sylgard 184) dégazé sous vide. Le mélange est ensuite versé sur un moule en résine de polyester puis placé à 70°C pendant au moins 3h pour permettre la réticulation. Les puces sont ensuite démoulées et les puits formés à l'aide d'un *punch* de biopsie de 3 à 4 mm de diamètre. Les puces et les lamelles de verres sont ensuite nettoyées à l'isopropan-2-ol et séchées avant d'être traitées pendant 200 secondes dans un générateur de plasma atmosphérique (puissance 98%, 0.6 mBar, Diener Electronics, Ebhausen, Allemagne). Le plasma provoque une modification transitoire de la

polarité de surface de l'élastomère polymérisé, naturellement hydrophobe et du verre. Plus précisément l'inversion de polarité se fait par oxydation des groupements silanes suite à l'élimination des groupements méthyles qui permettent alors la production de terminaison silanol (SiOH). Au niveau du PDMS, la présence de groupements silanols lui permet de se lier de manière covalente aux lamelles de verres par l'établissement de liaisons Si-O-Si. Afin de maintenir les propriétés hydrophiles du PDMS suite à l'oxydation, de l'eau stérile est placée dans chacun des puits de chaque chambre. Les puces sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri puis stérilisées sous rayonnement UVs pendant 20 minutes. A l'issue de cette étape, l'eau est remplacée par une solution de Poly-D-lysine (PDL) (10 μ g/mL, Sigma), pour permettre l'adhésion des cellules et les puces sont placées dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pour la nuit. Le lendemain, avant la dissection, les puces sont lavées avec une solution de laminine (5 μ g/mL, Sigma) afin de faciliter la croissance des prolongements axonaux.



Figure 52. Schéma illustrant le processus de production des puces microfluidiques. D'après *elveflow.com*

B. Cultures de neurones primaires

1. Dissection et récupération des neurones

Tous les animaux utilisés ont été manipulés conformément aux normes européennes d'éthique et de bientraitance animale. Les souris SWISS femelle (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) au stade de gestation E16 sont sacrifiées par dislocation cervicale puis disséquées afin de prélever les embryons. Les structures corticales et hippocampiques sont prélevées à partir de ces embryons. Toutes les étapes de la dissection sont réalisées dans une solution de *Gey's balanced saline solution* (GBSS, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) complétée avec 0,1% de D-(+)-glucose (w/v) (Sigma, St Louis, MO, USA). Après rinçage dans une solution fraîche de GBSS glucosé, les structures sont digérées, pendant 15 minutes à 37°C, avec une

solution de papaïne (20U/mL, Sigma) reprise dans du DMEM-Glutamax (DMEM-High glucose-Glutamax supplement-pyruvate ; ThermoFisher #31966021) contenant 1% de Pénicilline/Streptomycine (PS, LifeTecnologies). La papaïne est ensuite inactivée par ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, v/v, GE HealthCare, Little Chalfont, UK). Les structures sont ensuite dissociées mécaniquement en présence de DNAse-I (100U/mL, Sigma). Les cellules sont ensuite centrifugées à 700 rpm (rotation par minute) pendant 6 min à température ambiante. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du DMEM/PS. Une deuxième centrifugation est réalisée pendant l'étape de comptage sur cellule de Malassez. Enfin, le culot est repris dans du milieu DMEM/PS complété avec 5% de SVF, du N2 (1/100) et du B27(1/50). Les volumes de suspensions cellulaires sont définis pour atteindre les concentrations cellulaires finales souhaitées.

2. Ensemencement et entretien des cultures

Pour l'ensemencement en puce 8C, les neurones de l'hippocampe sont utilisés à 15.10⁶/mL et ensemencés dans chaque chambre individuelle. Pour les cultures en réseau dans les puces 2c15, les neurones corticaux à 35.10⁶/mL sont ensemencés dans les chambres proximales tandis que les neurones hippocampiques à 10.10⁶/mL sont ensemencés dans la chambre distale. Ce différentiel de concentration renforce la projection des axones des neurones corticaux vers la chambre hippocampique. Après adhésion des cellules, le milieu de culture est ajouté dans chaque compartiment. De l'H₂O-EDTA est ensuite placée au fond des boîtes de Pétri pour éviter l'évaporation et les boîtes sont enfin incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% CO₂. Dans les dispositifs 2c15, les axones des neurones corticaux entrent dans les micro-canaux et atteignent la chambre distale en 4-5 jours. Les cultures sont ensuite maintenues pendant 18 jours *in vitro* (JIV) avec un renouvellement du milieu chaque semaine.

C. Traitements pharmacologiques

1. Préparation des oligomères d'Aβ

Les oligomères d'A β_{1-42} et les formes non oligomériques sont produites selon le protocole de Ladu M.J. *et al.*, 2003. Plus précisément, sous sorbonne, les peptides β -amyloïdes₁₋₄₂ polymorphes fournis par Tocris sont solubilisés dans du 1,1,1,3,3,3- hexafluoro-2-propanol (HFIP) à une concentration de 1mM. La solution est laissée à température ambiante pendant 30 min. Pour la dernière étape de linéarisation du peptide, la solution est

aliquotée et les tubes sont placés toute la nuit sous sorbonne pour permettre l'évaporation du solvant. Les traces de solvant sont ensuite éliminées à l'aide d'un SpeedVac pendant 1h (6 mTorr). Le peptide dans une forme lyophilisée est alors stocké à -20°C.

Pour obtenir des oligomères d'A β_{1-42} , le lyophilisat est repris dans 2 µL de DMSO stérile à température ambiante. La solution est centrifugée pendant 20 secondes. Le mélange A β_{1-42} /DMSO est ensuite repris dans 98 µL de DMEM-F12 frais (Life Technologies) pour une concentration finale de 100 µM. La solution est ensuite transférée à 4°C pendant 24 heures avant toute utilisation.

Pour obtenir une forme non oligomérique, le lyophilisat est repris dans 2 μ L de DMSO stérile. La solution est ensuite vortexée pendant 30 secondes puis centrifugée 20 secondes. 98 μ L d'eau fraîche stérile sont ajoutés pour obtenir une solution finale à 100 μ M. La solution est enfin vortexée pendant 15 sec et peut être utilisée directement.

2. Sélection des circuits et traitements pharmacologiques

Après dix-huit jours de culture (JIV18), les circuits de chaque puce, destinés au traitement pharmacologique sont sélectionnés après observation sous microscopie à lumière transmise. Les critères de sélection, reposent sur une répartition homogène des cellules dans les chambres corticales et hippocampiques dans les dispositifs 2c15 ainsi que dans les chambres individuelles des neurones de l'hippocampe des puces 8C. La survie neuronale est évaluée par observation de l'état du soma (bonne réfringence et absence de formation d'agrégats de corps cellulaires) et des prolongements axonaux (pas de bourgeonnements). La densité dans des neurones de l'hippocampe est un critère très important également, car une densité cellulaire trop élevé sera un obstacle pour l'acquisition des photos et l'interprétation des résultats.

Dans les réseaux de neurones, en puce 2C15, les neurones corticaux, en chambre proximale, sont traités ou non avec une dose sub-toxique (10 nM) de peptide A β_{1-42} sous sa forme oligomérisée ou non oligomérisée. Pour évaluer l'effet des inhibiteurs de CASP-2, les molécules sont placées en même temps dans la chambre hippocampique (**Figure 53A**). Dans les dispositifs 8c, les co-traitements A β_{1-42} /Inhibiteurs sont déposés dans la même chambre (**Figure 53B**). Les solutions intermédiaires d'A β_{1-42} et d'inhibiteurs sont préparées dans du DMEM/PS tandis que toutes les solutions finales de traitement sont préparées dans du milieu DMEM complété avec 5% de SVF, du N2 et du B27 sans antioxydant.

L'application des traitements s'effectue par renouvellement complet du milieu de culture de la chambre considérée ou des deux chambres, en générant un flux par un dépôt de volume différent entre les puits du haut et du bas des chambres ($35 \mu L > 45\mu L$). Les circuits non traités sont également soumis à un renouvellement du milieu de culture (DMEM complet sans antioxydant) de manière à éviter les biais de résultats dus aux flux générés. Les traitements sont effectués pendant 6 heures à $37^{\circ}C$, $5\% CO_{2}$.



Figure 53. Conditions de traitements.

(Å) En puce 8c, sur les neurones hippocampiques seuls. (B) Combinaisons de traitements sur les réseaux de neurones Cortex \rightarrow Hippocampes en dispositif 2c15.

D. Étude de la perte synaptique

1. Immunocytochimie

A l'issue des 6 heures de traitement, les circuits et chambres individuelles sont fixés pendant 10 minutes, à température ambiante, à l'aide d'une solution de PBS-paraformaldéhyde (PFA, Sigma) + Sucrose 4 % (w/v). Pour permettre une pénétration totale de la PFA dans les circuits, un flux de 10 μ L est généré dans chaque chambre. Le temps de fixation ne doit pas excéder les 10 min afin de préserver l'intégrité des structures synaptiques. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de PBS+Azide 0.1% pendant 5 minutes et peuvent être stockées à 4°C dans l'attente de l'immunomarquage.

L'introduction des réactifs dans chaque circuit est réalisée en créant un flux en déposant des volumes différents entre les puits des chambres du dispositif et toutes les incubations sont effectuées à température ambiante, excepté pour l'incubation avec les anticorps primaires. Le jour du marquage, les cellules sont lavées avec une solution de PBS+Azide 0.1% pendant 5

minutes puis perméabilisées 10 minutes avec une solution de PBS azide 0,1% - TritonX-100 0,5% (v/v). La saturation des sites aspécifiques est assurée par une incubation de 30 minutes des cellules perméabilisées avec une solution de PBS+Azide 0.1% + BSA (sérum albumine bovine, filtrée 0,22 μ m, Sigma) 1% (w/v).

Ensuite, les anticorps primaires préalablement dilués dans une solution de PBS+Azide0,1%+BSA1% sont déposés et les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont rincées avec une solution de PBS+Azide 0.1% + BSA 1% pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite mises en contact avec les anticorps secondaires, dilués au préalable dans une solution de PBS+Azide 0.1%, pendant 2 heures à température ambiante et à l'abris de la lumière. Après un rinçage de 5 minutes avec une solution de PBS+Azide 0.1%, les cellules sont incubées 1 heures avec un solution d'anticorps couplés. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont rincées deux fois 5 minutes avant d'être placées à 4°C dans l'attente des prises de photos

Les différents anticorps primaires utilisés sont les suivants : Anti-Bassoon (Bassoon, mouse monoclonal, EnzoLifeSciences, #SAP7F407). Les anticorps secondaires utilisés sont des Donkey anti-espèce spécifique (Merck Millipore) couplés à des fluorochromes Alexa-350, - 488, -555. Les anticorps couplés utilisés sont : Anti-Beta III Tubulin Antibody, Alexa Fluor® 488 Conjugate (Merck Millipore, # AB15708A4), Anti-MAP2-Alexa555 (Clone AP20, Merck Millipore, # MAB3418A5). Le marquage de l'actine-F a été obtenu en utilisant de la phalloïdine directement couplée à un fluorochrome Alexa 555 (ThermoFischer Scientific, #A34055). Les noyaux sont marqués au Hoescht 33342 (2 µg/mL) pendant 10 minutes.

Les dilutions des différents anticorps utilisés en fonction des dispositifs sont répertoriées dans le tableau *ci-dessous*.

Dispositifs	Туре	Cible	Souche	Dilution	λ _{Em} (nm)
2c15	Anticorps primaire	Alpha-synuclein	Rabbit	1 :500	-
	Anticorps secondaire	Anti-Rabbit	Donkey	1 :500	350
	Anticorps	MAP2 couplé		1 :500	555
	couplés	βIII-Tubulin		1 :500	488
8c	Anticorps primaire	Bassoon	Mouse	1 :400	-
	Anticorps secondaire	Anti-mouse	Donkey	1 :500	488
	Anticorps	MAP2	-	1 :500	647
	couplés	Actine-F	Toxine	1 :100	555
			Phalloïdine		

2. Microscopie à fluorescence

Les images sont acquises à l'aide d'un microscope Axioobserver Z1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une caméra CCD refroidie 12 bits (CoolsnapHQ2, Ropert Scientific, Tucson, AZ, USA). Le microscope est piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La perte synaptique étant évaluée sur les neurones hippocampiques, une série de 4 à 6 photos est obtenue pour chaque chambre distale pour les puces 2c15 et pour chaque chambre individuelle des dispositifs 8C, en conservant les mêmes paramètres d'acquisition. Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ[®].

3. Quantification de la perte synaptique

La déconnexion synaptique est évaluée par microscopie à fluorescence en comptant les clusters d' α -synucléine accolé à des dendrites des neurones hippocampiques positives à MAP2 dans le cas des réseaux de neurones. Tandis que pour les cultures de neurones de l'hippocampe la colocalisation des marqueurs pré-synaptique Bassoon et post-synaptique actine-F porté par des dendrites positives au MAP2. Avant quantification de la perte synaptique, les images sont traitées ensemble à l'aide d'une macro pour ajuster les paramètres de brillance et de contraste. Le bruit de fond est également réduit et le signal maximisé afin d'avoir le meilleur rapport signal/bruit tout en s'assurant de ne pas perdre de données.

La densité synaptique est ensuite effectuée manuellement sur Image J ou de manière automatique à l'aide du *plugin* SynapCountJ. Ce dernier a été développé par deux équipes de l'Université de la Rioja, en Espagne (Mata G. *et al.,* 2017). La procédure de quantification des synapses est basée sur la superposition de 3 images prises d'un même neurone : marquage

pré et post synaptique avec un marquage de la structure du neurone. Ainsi, les dendrites d'intérêt (secondaire et tertiaires uniquement) sont définies à l'aide du plugin *neuronJ* puis la quantification est lancée automatiquement sur la colocalisation des marqueurs *pré* et *post*-synaptiques au niveau des arborisations dendritiques préalablement définies. Les comptages sont validés au préalable manuellement afin de définir les seuils de détection. A l'issue de la quantification automatique, les valeurs des densités synaptiques pour chaque dendrite de chaque neurone pris en photo, sont récupérées et traitées à l'aide du Logiciel Prism[®].

E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec les tests non-paramétriques de Kruskall-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's pour comparer plusieurs conditions.

* p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001.

V. Étude de la cytotoxicité des inhibiteurs sur des cultures primaires de neurones corticaux

Le XTT ((2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium-5-carbox-anilide) est un dérivé de sel de tétrazolium. Dans les cellules vivantes, les hydrolases mitochondriales vont être capables, en présence de PMS, de réduire le XXT pour former un colorant soluble orangé, le formazan, dont l'absorbance peut être mesurée à 485 nm. Ainsi, l'intensité du marquage est proportionnelle aux nombres de cellules métaboliquement actives donc vivantes. Ce test d'activité mitochondriale permet donc d'évaluer la viabilité cellulaire. Dans les expériences de contrôle, les cellules sont traitées par le véhicule des molécules (DMSO), utilisé pour la plus forte concentration. Pour chaque puits, le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par le calcul du rapport au témoin (DMSO). La molécule est considérée comme non cytotoxique lorsque le pourcentage de survie cellulaire est supérieur à 75%. Les expériences ont été réalisées deux fois en quatriplicat.

Pour l'étude de la cytotoxicité les neurones corticaux, obtenus en plus grands nombres au cours des dissections, sont utilisés. La suspension cellulaire de neurones corticaux à 35.10⁶/mL obtenue à l'issue des étapes de dissection et de dissociations sont diluées à une concentration de 1.10⁶/mL dans du milieu DMEM complété avec 5% de SVF, du N2 (1/100) et du B27(1/50). De telle façon à ce que les cellules soient ensemencées à une densité de 100 000 cellules/puits dans des plaques 96 puits transparentes stériles. Les plaques sont traitées la veille de l'ensemencement avec de la PDL puis rincées 3 fois avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline, w/o Ca, Mg ; ThermoFisher #14190094) avant la mise en contact avec les cellules. Ces dernières sont cultivées 4 jours en plaques, à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

Les cellules sont ensuite mises en présence des inhibiteurs à différentes concentrations (100 ; 10 ; 2,5 ; 0,1 ; 0,01 μ M) et incubées pendant 48h. Le milieu est ensuite remplacé par une solution de 50 μ L de XTT (à 0,3 mg/mL dans du milieu DMEM F12 (sans rouge de phénol) ; 8,3 μ M de PMS, Sigma-Aldrich). Les cellules sont incubées pendant 3h à 37 °C puis l'absorbance est mesurée à 485 nm.

RESULTATS - PARTIE I -

PEPTIDES INHIBITEURS DU SITE ACTIF

I. Considérations générales sur les propriétés enzymologiques de la Caspase-2

Disposer de substrats les plus spécifiques et affins possibles constitue un véritable enjeu dans le développement de test enzymatique miniaturisé. Sur ces considérations, nous avons étudié dans nos tests d'activités *in vitro*, le clivage par les CASP-2 et -3 recombinantes d'un panel de substrats de Caspases afin d'optimiser les conditions expérimentales qui serviront par la suite à évaluer nos inhibiteurs.

Les propriétés enzymologiques des Caspases sont gouvernées par une spécificité stricte de clivage après un résidu Asp en position P1 du substrat. Classiquement les substrats utilisés pour les mesures des activités Caspases *in vitro* se base sur la classification en trois groupes, établie par Nancy Thornberry en 1997. Dans cette classification, les membres sont regroupés en fonction de leur spécificité de reconnaissance envers des motifs majoritairement tétrapeptidiques. D'ailleurs, les membres du groupe I (CASP-1, -4 et -5) reconnaissent un motif (W/L)EHD. Les Caspases du groupes II (CASP-2, -3 et -7) sont spécifiques d'une séquence DE(V/H)D, (où X = V/H). Enfin le groupe III (CASP-6, -8, -9 et -10) reconnait préférentiellement une séquence (L/V)EXD. Parmi les Caspases, la CASP-2 est particulière dans le sens où elle nécessite une reconnaissance étendue jusqu'au résidu en position P5 pour exercer efficacement son activité protéolytique. L'une des séquences qu'elle reconnaît et clive efficacement est le motif pentapeptidique VDVAD.

Comme en témoigne la **Figure 54A**, nous avons pu confirmer cette propriété dans nos conditions expérimentales *in vitro*. En effet, la CASP-2 reconnaît et clive uniquement le substrat pentapeptidique Ac-VDVAD-AMC et présente une activité négligeable *vis-à-vis* du substrat de CASP-3, Ac-DEVD-AMC. En revanche, comme montré en **Figure 54B**, la CASP-3 reconnaît et clive son substrat préférentiel, Ac-DEVD-AMC, mais elle est aussi capable de reconnaître le substrat de la CASP-2. La CASP-2 possède un K_M de 13,57 ± 1,6 μ M *vis-à-vis* d'Ac-VDVAD-AMC et CASP-3 a des K_M de respectivement 12,3 ± 1,2 μ M et 33,3 ± 2,3 μ M *vis-à-vis à-vis* des substrats Ac-DEVD-AMC et Ac-VDVAD-AMC.

Ainsi, la CASP-2 ne reconnaît que le motif pentapeptidique VDVAD-CHO tandis que la CASP-3 est capable de reconnaître et de cliver aussi bien son substrat préférentiel tétrapeptidique DEVD que le motif VDVAD.

Ces résultats permettent également de confirmer que les CASP-2 et -3 reconnaissent peu ou pas les substrats des Caspases des autres groupes : CASP-1 (YVAD/WEHD), CASP-6 (VEID) et CASP-8 (IETD).

Enfin, nous avons pu démontrer que comme les autres Caspases initiatrices, la CASP-2 est suractivée par la présence d'un agent chosmotropique comme indiqué sur l'histogramme en **Figure 54C**. En effet, l'ajout extemporané de sodium-succinate dans le tampon d'activité de la CASP-2 permet d'augmenter de manière dose dépendante son activité *in vitro*. D'ailleurs, en comparaison à l'absence d'agent chosmotropique, l'addition de 800 mM de succinate permet d'augmenter d'un facteur 3, l'activité de la Caspase dans nos tests cinétiques.

Par conséquent, la CASP-2, nécessite de reconnaître un résidu en P5 pour exercer son activité de clivage de manière optimale et elle reconnait très préférentiellement le motif VDVAD. *In vitro*, l'ajout de succinate de sodium améliore considérablement son activité. Pour la CASP-3 la spécificité n'est pas aussi stricte puisqu'elle reconnait et clive les motifs DEVD et VDVAD.



Figure 54. Optimisation des conditions expérimentales pour l'étude des activités CASP-2 et -3. (A) Spécificité de reconnaissance de la CASP-2 *vis-à-vis* de 6 substrats de Caspases. (B) Étude de la spécificité de clivage de la CASP-3. (C) Effet de l'ajout de succinate de sodium dans le tampon d'activité de la CASP-2. En ordonnées sont représentées les valeurs des activités des activités enzymatiques exprimées en unité de fluorescence arbitraire (RFU) par minute.

II. Inhibiteurs généraux de Caspases

Dans la quête de la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques qui impliquent les Caspases et plus particulièrement la CASP-2, le développement d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs apparaît comme une étape incontournable. Ce premier chapitre des Résultats propose de compléter les évaluations des inhibiteurs généraux de première génération par une étude mécanistique approfondie.

L'objectif de la thèse étant de développer des inhibiteurs de CASP-2 avec des effets souhaités très modérés sur la CASP-3, les études ont été menées sur les deux Caspases en parallèle afin d'étudier les paramètres de sélectivité des molécules *vis-à-vis* de ces deux enzymes.

En termes d'organisation, la structure des inhibiteurs peut être divisée en trois parties, la région N-terminale suivi d'une séquence intermédiaire (P5)/P4-P1 et un groupement P1'en C-terminal de la séquence. Pour la vaste majorité des inhibiteurs peptidiques, un groupement

électrophile prend place en P1' afin d'établir un lien covalent transitoire ou permanant avec la cystéine catalytique.

A. Peptides aldéhydes – Inhibiteurs réversibles de première génération

Tout comme les substrats fluorogènes fonctionnalisés par AMC, la première génération d'inhibiteurs de Caspases s'est construite sur la base des motifs préférentiellement reconnus par les membres de cette famille d'enzyme, toujours selon la classification élaborée par Nancy Thornberry et ses collègues. Les motifs tétra- ou pentapeptidiques sont ensuite fonctionnalisés avec un groupement acétyle (Ac) en N-ter et un groupement électrophile aldéhyde (-CHO) en C-ter. **En Figure 55** sont représentées les structures des peptides aldéhydes Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO conçus pour inhiber les CASP-2 et -3 respectivement.



Figure 55. Structures des peptides aldéhyde de première génération conçus pour inhiber les CASP-2 et -3. Les inhibiteurs sont conçus pour contenir les séquences préférentiellement reconnues par les Caspases cibles et sont fonctionnalisés avec un acétyle en N-ter et un groupement aldéhyde en C-ter.

1. Pouvoir inhibiteur et mécanisme d'action

Les pouvoirs inhibiteurs des molécules *vis-à-vis* des CASP-2 et -3 ont été quantifiés par la détermination des valeurs des IC₅₀. Cette valeur seule ne préjuge pas du mécanisme d'inhibition mais elle est utilisée comme indice de l'efficacité d'inhibition et permet ainsi de hiérarchiser les effets des molécules sur les enzymes cibles. Les résultats sont présentés dans la partie droite du tableau en **Figure 57A**. On peut voir que la CASP-2 reconnaît efficacement le peptide Ac-VDVAD-CHO comme en témoigne la valeur de l'IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire (8,9 ± 0,33 nM). En revanche, le composé est aussi efficacement reconnu par la CASP-3 avec une IC₅₀ de 9,0 ± 0,4 nM. En revanche, si le composé Ac-DEVD-CHO est puissant sur la CASP-3 avec une IC₅₀ au sub-nanomolaire de 0,7 ± 0,03 nM, le tétrapeptide est plus faiblement reconnu par la CASP-2 avec une IC₅₀ de 3,9 ± 1,9 μ M. Bien que l'inhibition reste efficace, ce différentiel dans l'effet de Ac-DEVD-CHO résulte de l'importance de reconnaître un résidu en P5 pour un effet optimal par la CASP-2.

En termes de mécanisme d'inhibition, ces peptides aldéhydes sont connus pour établir un lien covalent transitoire avec la cystéine de la dyade catalytique. Plus précisément, la Cys-285, préalablement activée par l'Histidine, attaque le centre électrophile au niveau du carbone du carbonyle de l'aldéhyde. Un lien covalent transitoire est donc établi entre l'inhibiteur et l'enzyme (**Figure 56A**). Nous avons validé ce mécanisme d'action *in vitro* à l'aide de la méthode de dilution. En effet, suite à une dilution du complexe CASP/Inhibiteur au 100^e l'activité est restaurée à environ 40 %. De plus, le traitement du complexe E/I avec 500 µM d'un puissant nucléophile, l'hydroxylamine (NH₂OH, pH 8) permet de restituer l'activité enzymatique à plus de 95 %. Ces résultats sont illustrés en **Figure 56B** avec l'étude de la réversibilité de l'inhibition du composé Ac-VDVAD-CHO sur la CASP-2. Ces observations sont donc en accord avec l'établissement d'un lien covalent transitoire qui permet une inhibition réversible de l'enzyme cible.



Figure 56. Les peptides aldéhydes agissent en formant un lien covalent transitoire avec la cystéine catalytique à 37°C pH 7,4.

(A) Mécanisme d'action proposé pour ces inhibiteurs. (B) Réversibilité de l'inhibition mise en évidence par la méthode de dilution. Suite à l'ajout d'un puissant nucléophile, le complexe Enzyme/Inhibiteur est dissocié. Ici, inhibition étude de la réversibilité de l'inhibition par le composé Ac-VDVAD-CHO, avant dilution [Ac-VDVAD-CHO] : 200 nM ; après dilution du complexe Ac-VDVAD-CHO : 2 nM. [CASP-2] : 0,2 nM ; [Ac-VDVAD-CHO] : 200 nM.

2. Quantification du pouvoir inhibiteur

L'étude approfondie du mécanisme d'inhibition a été réalisée par mise en compétition des peptides aldéhydes avec les substrats *vis-à-vis* des Caspases. Les représentations en doubleinverse de Lineweaver-Burk sont présentées en **Figures 57B et C** pour le composé Ac-VDVAD-CHO sur les CASP-2 et -3.

Les points expérimentaux obtenus en variant la concentration en substrat et en inhibiteur permettent d'obtenir des droites avec une intersection commune au niveau de l'axe des

ordonnées. Il s'agit donc, d'inhibiteurs réversibles compétitifs dont le schéma cinétique de Michaelis-Menten est représenté *ci-dessous*.

$$E \xrightarrow{k_1, S} E \cdot S \xrightarrow{k_2} E + P$$

$$k_{-i} \downarrow k_{i}, I$$

$$E \cdot I$$

Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur et le substrat sont en compétition *vis-à-vis* du site actif de l'enzyme.

La vitesse initiale V₀, est exprimée selon l'**équation 1**, où V_{max} est la vitesse maximale de réaction (atteinte lorsque l'enzyme est saturée en substrat), [S] la concentration en substrat, K_M est la constante de Michaelis-Menten (concentration en substrat correspondant à V_{max}/2), Ki est la constante de dissociation (k_{-i}/k_i) qui rend compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Pour les inhibiteur réversibles, la constante Ki est utilisée comme indicateur de l'efficacité inhibitrice. Aussi, plus sa valeur est faible, plus l'inhibiteur est puissant.

$$\frac{1}{V0} = \frac{1}{Vmax} + \frac{\left(1 + \frac{|I|}{Ki}\right) \times Km}{Vmax} \times \frac{1}{|S|}$$
 (éq. 1)

Les tracés secondaires obtenus à partir des données des graphiques de Lineweaver-Burk ont permis de déterminer graphiquement (intersection de la droite avec l'axe des abscisses) et par le calcul, les valeurs de Ki de chaque inhibiteur pour les CASP-3 et -2. Le rapport de ces constantes permet d'obtenir l'index de sélectivité. Les valeurs de chacun de ces paramètres sont répertoriées en **Figure 57A**.

Les valeurs des Ki confirment et viennent compléter les informations apportées par les données IC₅₀. Comment attendu, le composé Ac-VDVAD-CHO est très afin de la CASP-2 avec un Ki de 6 nM. Cependant il est aussi puissant sur la CASP-3 avec un Ki de 8 nM. L'index de sélectivité résultant du rapport des constantes n'est donc que très faiblement en faveur de la CASP-2 avec un ratio de 1,22. Ac-DEVD-CHO est très efficace sur la CASP-3 avec un Ki de l'ordre du sub-nanomolaire (0,2 nM) tout en étant bien moins efficace sur la CASP-2 avec un Ki de 3,2 μ M.

Ces peptides aldéhydes sont donc des inhibiteurs réversibles des CASP-2 et -3 et exercent leur effet inhibiteur en agissant en compétiteur du substrat naturel *vis-à-vis* du site actif de l'enzyme. Bien qu'ils constituent des inhibiteurs puissants avec des constantes

d'inhibition de l'ordre du nanomolaire voire sub-nanomolaire, ils ne présentent aucun avantage du point de vue de la sélectivité envers la CASP-2. Néanmoins le peptide Ac-DEVD-CHO présente une forte sélectivité *vis-à-vis* de la CASP-3 (ratio Ki CASP-2/ Ki CASP-3 = 16110).



Figure 57. Les inhibiteurs Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO sont des inhibiteurs réversibles compétitifs efficaces des CASP-2 et -3.

(A) Tableau récapitulatif des constantes cinétiques Ki (B – C) Mécanismes d'inhibition des CASP-2 (B) et -3 (C) par le peptide aldéhyde Ac-VDVAD-CHO. Représentations de Lineweaver-Burk (gauche) et tracés secondaires correspondant (droite) pour l'inhibiteur compétitif Ac-VDVAD-CHO. (B) [Ac-VDVAD-CHO] CASP-2 = 0 (o) ; 3,125 (\diamond) ; 6,25 (\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 25 (\diamond) ; 50 nM (\diamond). (C) [Ac-VDVAD-CHO] CASP-3 = 0 (o) ; 6,25(\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 20 nM (\diamond). Les activités des CASP-2 et 3 sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC et Ac-DEVD-AMC en fluorescence à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 100 (\diamond) ; 25 (\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 25 ; 50 ; 100 μ M et [Ac-DEVD-CHO]₀ : 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 μ M. Les expériences ont été réalisées 2 fois en duplicata (erreur < 10%).

B. Inhibiteurs irréversibles de seconde et troisième génération

1. Présentation des molécules et hiérarchisation de l'effet

Comme nous avons pu l'évoquer en introduction, une autre approche dans le développement d'outils pharmacologiques consiste en la conception d'inhibiteurs irréversibles. D'ailleurs, les composés halométhyl-cétone (fluorométhy-cétone, fmk) et acyloxyméthyl-cétone (difluorophenoxyméthyl-cétone, OPh) sont des inhibiteurs irréversibles populaires de Caspases. Les structures des différents composés testés au cours de la thèse sont présentées en (Figure 58A). Au même titre que les peptides aldéhydes, ces derniers sont tous conçus selon le même modèle, un groupement en N-ter, pour améliorer les paramètres pharmacocinétiques, suivi d'une séquence peptidique reconnue par les Caspases et un groupement électrophile en P1'. Nous avons également évalué le peptidomimétique, Emricasan, actuellement en développement clinique (société Conatus). Ce dernier présente une séquence pseudo-peptidique, avec des acides aminés non-naturels. La présence de tels groupements permet d'augmenter la stabilité et la biodisponibilité du composé dans un contexte cellulaire et chez l'humain. Toutefois, toutes ces molécules admettent un résidu Asp en P1, un élément requis pour la reconnaissance par les Caspases. Le composé Q-VE-OPh a aussi été étudié comme contrôle (remplacement du résidu Asp par un résidu Glu non reconnu par les caspases de mammifères).

Les valeurs des IC₅₀, référencées en **Figure 58B**, ont été déterminées pour ces composés et permettent d'établir une première hiérarchisation de l'effet des composés sur les CASP-2 et - 3. Ainsi, sur les deux enzymes et notamment sur la CASP-2, le composé Q-VE-OPh apparait comme étant pas ou peu reconnu avec une IC₅₀ de 10,9 \pm 0,8 μ M sur la CASP-3. Afin de protéger les composés de la dégradation, des groupements *O*-Méthyl sont greffés aux chaînes latérales des résidus Asp, tel est le cas pour l'inhibiteur de seconde génération z-VAD(*O*Me)-fmk. Si cette modification présente un atout dans un contexte cellulaire, elle impacte considérablement l'efficacité du composé sur système purifié. En effet, la présence d'un tel groupement diminue de 40 fois la reconnaissance par la CASP-2 et de 180 fois la reconnaissance par la CASP-2 et de 180 fois la reconnaissance par la CASP-2 et -3, respectivement 84,7 \pm 3,0 et 10,9 \pm 0,4 nM. Par rapport au z-VAD-fmk, la présence du motif pentapeptidique VDVAD semble améliorer l'effet sur la CASP-2 avec une

IC₅₀ environ deux fois plus faible de 44,9 \pm 2,4 nM. Ce composé, z-VDVAD-fmk, est également très bien reconnu par la CASP-3 avec une IC₅₀ 6,8 \pm 0,3 nM. Si le composé de référence de troisième génération, pan-caspase Q-VD-OPh, semble être efficace sur la CASP-3 au vu des valeurs des IC₅₀, l'effet sur la CASP-2 est légèrement plus modéré avec une IC₅₀ 290 fois plus forte à 694,8 \pm 7,7 nM. Enfin, le Emricasan semble être très bien reconnu par les deux Caspases avec des valeurs d'IC₅₀ similaire autour de 9 nM. Toutefois, ces valeurs ne permettent pas de conclure sur l'efficacité mais permettent seulement d'appréhender l'effet des molécules *vis-à-vis* des enzymes cibles.



Figure 58. Inhibiteur de seconde et troisième génération.

(A) Structures des composés halométhyl-cétones, acyloxyméthyl-cétone et du peptidomimétiques Emricasan. (B) Tableau récapitulatif des IC₅₀ obtenus *vis-à-vis* des CASP-2 et -3. Les molécules sont incubées pendant 30 minutes avec les enzymes. L'activité est ensuite initiée par ajout du substrat. Les activités des CASP-2 (0,2 nM) et 3 (0,1 nM) sont mesurées respectivement pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μ M) et Ac-DEVD-AMC (10 μ M) en fluorescence/minute à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1 mg/mL de BSA ; pH 7,4. « nd » : Pas d'effet inhibiteur à 100 μ M.

2. Mécanismes d'action des composés

Les mécanismes d'inhibition de ces composés ont été caractérisés sur les CASP-2 et -3, afin de déterminer l'efficacité et la sélectivité des composés *vis-à-vis* des deux enzymes.

La nature irréversible de ces composés a été mise en évidence grâce à la méthode de dilution ainsi qu'au traitement par l'hydroxylamine (NH₂OH), un puissant nucléophile. En effet, à l'issue de ces deux expériences, l'activité enzymatique n'est pas restituée. Ces résultats sont exemplifiés, en **Figure 59A**, avec le composé Q-VD-OPh sur l'activité CASP-2. On peut constater qu'à la suite de la dilution au 100^e du complexe Enzyme/Inhibiteur l'inhibition est maintenue à 100 %. De même, après le traitement avec l'hydroxylamine à 500 μ M, pH 8 l'activité de la CASP-2 n'est pas restituée. Par conséquent nous pouvons en conclure que l'inhibition est accompagnée d'une modification covalente de l'enzyme.

Ces inhibiteurs irréversibles, sont tous des agents alkylants qui forment un thioéther avec la Cystéine catalytique. Sans données structurales, nous proposons deux mécanismes d'action pour expliquer les effets de ces molécules.

Un premier mécanisme pour les composés z-VAD-fmk et Q-VD-OPh est proposé en **Figures 59C et D.** La formation rapide du complexe non covalent de Michaelis (E·I) où la cystéine activée par l'histidine, attaque la fonction CH₂ en alpha de l'aryléther ou du fluor, *via* son thiolate, conduit directement à la libération du groupement partant (difluorophénol ou fluorure d'hydrogène). Cette étape permet ainsi la formation du produit thioéther (EI). Plus précisément cette étape conduit à l'alkylation de la cystéine du site actif.

Un deuxième mécanisme d'action pourrait être également proposé (**Figure 59B**). Dans ce modèle, la dyade catalytique existe sous forme de paire thiolate et imidazolium où le noyau imidazole de l'Histidine est en position pour polariser le carbonyle du groupement cétone de l'inhibiteur. La cystéine *via* son thiolate attaque le centre électrophile au niveau du carbone du carbonyle de la cétone, conduisant ainsi à la formation d'un complexe intermédiaire thiohémiacétal, stabilisé au niveau d'un trou oxyanion (formé par l'association des chaines latérales de la Cys catalytique et d'une Gly). Ensuite, une molécule d'eau positionnée à proximité de l'inhibiteur *via* l'établissement d'une liaison hydrogène avec la Gly du trou oxyanion, pourrait transférer un proton au groupe partant. Ce dernier mécanisme a été proposé par Powers J.C. *et al.*, en 2002 pour ce type d'inhibiteur sur la CASP-1 et pourrait être étendu aux CASP-2 et -3.



Figure 59. Mécanismes d'action des peptides inhibiteurs généraux de Caspases. (A) Étude de la réversibilité de l'inhibition de la CASP-2 par l'inhibiteur pan-Caspases Q-VD-OPh par la méthode de dilution. L'enzyme est incubée l'inhibiteur pendant 30 minutes. Les concentrations en inhibiteurs sont choisies pour qu'avant dilution du complexe E/I l'enzyme soit inhibée à plus de 80 % et à moins de 20 % après dilution du complexe. La réaction est lancée par ajout d'une solution contenant le tampon d'activité et le substrat. Ensuite, afin de mettre en évidence l'établissement d'un lien covalent, le complexe E/I est mise en présence de l'hydroxylamine à pH 8. Pour l'inhibiteur Q-VD-OPh la dilution et la présence de l'hydroxylamine ne permettent pas de restituer l'activité enzymatique puisque l'enzyme demeure inhibée à 100 %. Le composé Q-VD-OPh est donc un inhibiteur irréversible de CASP-2. (B) Mécanisme d'action proposé par Powers J.C. *et al.*, 2002 pour l'inhibition des Caspases par les inhibiteurs irréversibles généraux (C-D) Second mécanisme d'inhibition proposé sur la base des structures des composés pour les inhibiteurs fluorométhyl-cétone et acyloxyméthyl-cétone.

3. Quantification des paramètres cinétiques

L'efficacité inactivatrice des composés est donnée par le rapport k_{inact}/K_I, où k_{inact} est la constante de vitesse maximale d'inactivation, exprimée en s⁻¹ et le K_I, exprimé en Molaire, est la concentration de l'inhibiteur correspondant à la moitié de la vitesse maximale d'inactivation (k_{inact}/2) ; c'est une constante de dissociation qui rend compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. L'inhibition suit le chemin cinétique présenté en **Figure 60D**. De plus, plus la valeur de ce rapport est élevée plus l'inhibiteur est efficace. L'index de sélectivité est quant à lui déterminé par le rapport des efficacités inhibitrices de CASP-2 sur CASP-3.

Les valeurs des constantes et des rapports sont reportées dans le tableau en **Figure 60A**. Les méthodes Continues utilisées pour la caractérisation des inhibiteurs sont illustrées pour le

composé Q-VD-OPh sur les CASP-2 et -3 (**Figures 60B et C**). Les valeurs des constantes de vitesse d'inactivation pour chaque concentration en inhibiteurs, k_{obs} sont obtenues à partir du graphique représentation la libération du produit, en RFU au cours du temps. Ensuite, les valeurs de k_{inact} et K_I sont obtenues à partir du tracé k_{obs} = f ([I]).

Les valeurs des rapports kinact/KI valident la hiérarchie établie à partir des valeurs des IC50. Le composé Q-VE-OPh, est sans effet sur la CASP-2 et a une efficacité médiocre sur la CASP-3. Le z-VAD-fmk a une affinité pour les CASP-2 et -3 de respectivement 983 ± 49 et 316 ± 16 nM, alors que son homologue méthylé z-VAD(OMe)-fmk présente une affinité de l'ordre du micromolaire sur les deux enzymes. Cette diminution de l'affinité résulte en une diminution de 10 fois de l'efficacité inhibitrice du composé sur les CASP-2 et -3 en comparaison au z-VADfmk. En effet, on passe d'un rapport k_{inact}/K_I de 601 à 5.726 M⁻¹.s⁻¹ sur la CASP-2 à 777 à 7.911 nM sur la CASP-3. Il apparait donc que la présence du groupement OMéthyl sur la chaîne latérale de l'Asp du composé z-VAD(OMe)-fmk diminue considérablement l'affinité de la molécule vis-à-vis des deux Caspases. Comme le suggéraient les valeurs des IC₅₀, la présence du motif pentapeptidique VDVAD reconnu par les CASP-2 et -3, augmente d'environ deux fois l'efficacité inhibitrice, qui s'élève envers la CASP-2 à 10 505 M⁻¹.s⁻¹. Cette hausse du pouvoir inhibiteur est associée à une augmentation de 5 fois de l'affinité et à une diminution de la valeur de la constante d'inactivation. Cependant, le composé est encore plus puissant sur la CASP-3 avec un rapport de 30 548 M⁻¹.s⁻¹. Cette efficacité est liée à une meilleure affinité du composé z-VDVAD-fmk pour la CASP-3. Concernant, l'Emricasan, il agit de manière très efficace sur la CASP-3 avec un rapport k_{inact}/K_I de 32 658 M⁻¹.s⁻¹, et surtout il est encore plus puissant vis-à-vis de la CASP-2 avec une efficacité inhibitrice 2,3 fois supérieure qui s'élève à 75.311 M⁻¹.s⁻¹. Enfin, les données placent le composé Q-VD-OPh en tête en termes d'efficacité sur la CASP-3 avec un pouvoir inhibiteur de 167.267 M⁻¹.s⁻¹. En revanche, le composé est 180 fois moins puissant sur la CASP-2 avec un rapport de 907 M⁻¹.s⁻¹. Cette différence s'explique notamment par une différence considérable du composé pour les CASP-2 et -3, en effet Q-VD-OPh est 4 fois moins afin pour la CASP-2 et l'inactivation beaucoup plus lente de surcroit.



Figure 60. Les inhibiteurs généraux sont des inactivateurs non sélectifs des CASP-2 et -3.

(A) Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques obtenus pour chaque inhibiteur sur les CASP-2 et -3. (B et C) Cinétiques d'inactivations des CASP-2 (0,2 nM) et -3 (0,1 nM) par le composé pan-Caspase Q-VD-OPh mises en évidence par la méthode Continue à pH 7,4 et 37°C. La libération du produit en unité arbitraire de fluorescence (RFU) est suivi au cours du temps en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur. Sont accolés les graphiques secondaires permettant la détermination du rapport k_{inact}/K_I. Les activités des CASP-2 et 3 sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μ M) et Ac-DEVD-AMC (10 μ M) en fluorescence à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1 mg/mL de BSA ; pH 7,4. (B) [Q-VD-OPh] sur CASP-3 : 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,125 ; 1,5625 nM (C) [Q-VD-OPh] sur CASP-2 : 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 μ M. (D) Schéma cinétique de Michaelis-Menten des inhibiteurs irréversibles, avec k_{inact} qui est la constante de vitesse maximale d'inactivation et K_I la constante de dissociation qui rend compte de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. (Erreur < 7 %). Les expressions de π et de [I]' sont indiquées dans le « Matériels et Méthodes ».

Ces composés irréversibles de deuxième et troisième génération sont donc des agents alkylants des CASP-2 et -3. Ils agissent en inactivant l'enzyme de manière permanente *via* la
formation d'un thioéther avec la cystéine catalytique. En termes de sélectivité envers la CASP-2, ces composés sont médiocres, bien que le composé Emricasan soit plus efficace envers la CASP-2. Nous avons également pu montrer que la présence du motif VDVAD, préférentiel de la CASP-3 n'apporte aucune sélectivité en faveur de notre protéase d'intérêt. D'ailleurs, il est même plus efficace sur la CASP-3.

4. Étude de l'effet des inhibiteurs sur un modèle d'apoptose dépendant de la Caspase-2

4.1. Présentation du modèle HeLa - Vincristine

L'efficacité des composés a également été évaluée dans un contexte cellulaire. Plus précisément, les inhibiteurs ont été testés dans un modèle de mort cellulaire par apoptose dépendant de la CASP-2. Dans ce modèle, l'effet cytoprotecteur des inhibiteurs sur la mort cellulaire induite par la Vincristine est évalué par cytométrie en flux.

Pour cela, nous avons pu mettre en évidence que la vincristine, induit la mort par apoptose des cellules HeLa de manière dose dépendante, avec une cinétique comprise entre 24 et 36h (**Figures 61B**). Cette molécule est un alcaloïde issu de la pervenche de Madagascar qui se fixe à la tubuline et empêche la polymérisation des microtubules (**Figure 61A**). À 20 nM, pendant 24-48 heures, cet alcaloïde anti-mitotique et anti-cancéreux induit la mort cellulaire de lignées humaine de type HeLa, avec une population de cellules mortes (positives à l'Iodure de Propidium ; (IP)) de 45-55 %. Ces conditions ont donc été utilisées pour les traitements avec les inhibiteurs.

4.2. L'inhibition des caspases protège de la mort cellulaire induite par la Vincristine

Les effets obtenus avec les inhibiteurs dans ce modèle de mort cellulaire sont présentés en **Figure 8C** - **E**. Les résultats ont été obtenus en partie par Julie Anastasie, au laboratoire, et j'ai poursuivi son travail initial. Dans ce modèle, un pré-traitement avec les inhibiteurs généraux de Caspases, Emricasan, z-VAD(*O*Me)-fmk et Q-VD-OPh permettent de réduire de manière dose-dépendante de la mort cellulaire induite par la Vincristine à 48h dans les cellules HeLa, avec une dose optimale d'environ 30 µM. Plus précisément à cette concentration, Emricasan est le plus efficace et bloque à environ 90 % la mort (**Figure 61D**), tandis que Q-VD-OPh (**Figure 61E**) la bloque à 75 % devant z-VAD(*O*Me)-fmk (**Figure 61C**) qui lui permet de bloquer la mort à environ 60 %. Il est à noter que ce composé dans un contexte

216

cellulaire est efficace et son effet est à mettre en parallèle à l'effet de son homologue non méthylé dans les tests de cinétiques enzymatiques *in vitro*. En revanche, contrairement aux autres composés, le Q-VE-OPh n'a aucun effet sur la mort induite par la Vincristine (**Figure 61E**).

Ainsi, on dispose donc d'un système où la Vincristine induit l'apoptose dans les cellules HeLa de manière Caspase-dépendante avec un effet cytoprotecteur des inhibiteurs généraux de Caspases.





dépendante de la mort induite par 20 nM de Vincristine pendant 24h-48h, avec un effet optimal à 30 μM. (A) Structure de la Vincristine (alcaloïde issu de la pervenche de Madagascar) et exemple d'observation de cellulles HeLa traitées (photo de droite) ou non (photo de gauche) avec de la Vincristine (20 nM) puis traitées après 24h avec du Hoescht 33342 (marqueur de l'ADN ; bleu) et de l'iodure de propidium (rouge) avant observation par microscopie de fluorescence. Dans les cultures traitées par la Vincristine, On observe des cellules arrondies (anoikis) et présentant une condensation chromatinienne typique de l'apoptose, et d'autre cellules dont le noyau est souvent plus morcelé et qui sont marquées à l'iodure de propidium, suggérant une nécrose secondaire. (B) Dose-réponse de la Vincristine sur l'induction de la mort dans les cellules HeLa, représentée par le pourcentage de cellules positives à l'iodure de Propidium (IP) et analysées par cytométrie en flux. **(C-E)** Effet des inhibiteurs z-VAD(*O*Me), Emricasan et Q-VD-OPh à différentes concentrations sur la prévention de la mort cellulaires induite par la Vincristine. L'analyse est faite par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. Dans ce modèle, le prétraitement avec 30 μM de Q-VE-OPh ne prévient pas de la mort cellulaire. L'effet de ces inhibiteurs indique une mort Caspase-dépendante dans ce modèle.

5. Cytotoxicité des composés sur des neurones corticaux primaires

Enfin, les molécules Q-VD-OPh et z-VAD(*O*Me)-fmk ont été testées sur des cultures primaires, afin d'évaluer une éventuelle toxicité de ces molécules. Pour cela, des neurones

corticaux issu d'embryons (E16) sont cultivés en plaques 96 puits pendant 4 jours puis la toxicité des composés à 0,01 ; 0,1 ; 2,5, 10 et 100 μ M est évaluée, avec la roténone à 50 μ M en contrôle positif. Les résultats obtenus sont présentés en **Figures 62A et B**. Contrairement à la Roténone qui entraîne un mort cellulaire à plus de 95 %, les composés Q-VD-OPh et z-VAD(*O*Me)-fmk ne présentent aucun effet cytotoxique et ce, même à une dose de 100 μ M.



Figure 62. Les composés z-VAD(OMe)-fmk et Q-VD-OPh ne présentent aucune toxicité *vis-à-vis* de cultures primaires de neurones corticaux.

Les neurones issus d'embryons (E16) sont cultivés en plaque 96 puits transparentes dans du milieu DMEM complété du B27 et du N4 ainsi qu'avec 5% de SVF (v/v), 1% d'antibiotiques (v/v). Les cellules sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Après 4 *div* les cellules sont traitées pendant 48 heures avec les molécules à différentes concentrations. La cytotoxicité des molécules est évaluée à l'aide d'un test XTT. Un contrôle de mort cellulaire avec de la roténone à 50 μ M est également réalisés. (A) Évaluation de la cytotoxicité du composé z-VAD(OMe)-fmk. (B) Cytotoxicité de l'inhibiteur pan-caspase Q-VD-OPh. Les expériences ont été réalisées 3 fois (erreur < à 7%).

C. Effets croisés des inhibiteurs des premières générations sur les Cathepsines

Un des principaux reproches fait aux inhibiteurs de première et seconde génération est le manque de sélectivité *vis-à-vis* des Caspases et par conséquent leur effets croisés sur d'autres protéases et notamment sur les Cathepsines. Ces dernières sont des protéases impliquées dans la dégradation des protéines au niveau du lysosome. Dans nos conditions expérimentales, nous avons donc souhaité étudier les effets croisés des inhibiteurs de caspase à large spectre sur les Cathepsines B et L qui sont des protéases à Cystéine ainsi que sur la Cathepsine D qui est une protéase à Aspartate. Pour valider nos résultats, nous avons étudié en parallèle l'inhibiteur E64d ((2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester), connu pour inactiver efficacement les protéases à cystéines et notamment les Cathepsines B et L et la Calpaïne (Murray E.J. *et al.,* 1997 ; Hook G., *et al.,* 2015). Les valeurs des IC₅₀ ainsi que la valeur des Ki et des rapports k_{inact}/K₁ respectivement pour les inhibiteurs réversibles et irréversibles sont regroupées dans les deux tableaux en **Figures 63A et B**. Nos études nous ont

permis de valider que le composé E-64-D était un bon inhibiteur des Cathepsines avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire sur les Cathepsines B et L. La détermination de l' IC_{50} de ce composé n'a pas été poursuivie sur la Cathepsine D : mais nous avons pu néanmoins valider qu'à 10 μ M, le composé inhibait à plus de 70 % l'activité de cette enzyme. Aucun effet des inhibiteurs généraux testés sur la Cathepsine D n'a retenu notre attention.

Cependant sur la Cathepsine B, tous les composés testés, à savoir, le z-VAD-fmk, le Q-VD-OPh, le Emricasan et les deux peptides aldéhydes ont montré un effet croisé sur cette enzyme. Compte tenu des valeurs des IC₅₀, l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh et le composé Emricasan sont reconnus par la Cathepsine B avec des valeurs de l'ordre de la dizaine de micromolaire tandis que le composé z-VAD-fmk semble être très bien reconnu par celle-ci, avec une IC₅₀ de 15,4 \pm 1,1 nM. Les peptides aldéhydes Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO ont une IC₅₀ de respectivement 7,8 \pm 0,5 et 2,5 \pm 0,2 μ M.

Le mécanisme de ces inhibiteurs a été étudié. Les valeurs des rapports corroborent une nouvelle fois avec les données IC₅₀. En effet, les inhibiteurs Q-VD-OPh et Emricasan sont très peu efficaces *vis-à-vis* de la Cathepsine B, avec des rapports de respectivement 24,8 et 16,7 M⁻¹.s⁻¹. En revanche, le z-VAD-fmk a une bonne efficacité sur cette enzyme avec un rapport de 1.946 M⁻¹.s⁻¹. Pour les peptides aldéhydes, le mécanisme a été étudié par la méthode de compétitivité avec le substrat. La représentation graphique de Dixon nous a permis de conclure quant au type d'inhibition. En effet, les droites de la représentation graphique de 1/Vi = f ([I]) se croisent en un point commun au niveau de l'axe des abscisses. Par conséquent, Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO sont des inhibiteurs réversibles non compétitifs qui se fixent avec la même affinité à l'enzyme libre (Ki) et au complexe Enzyme/Substrat (Ki'), c'est-à-dire que Ki=Ki'. Le schéma cinétique de Michaelis-Menten pour ce type d'inhibiteur est représenté *ci-dessous*.

$$E \xrightarrow{k_1, S} E \cdot S \xrightarrow{k_2} E + P$$

$$K_i \left| \left| I \xrightarrow{k_1', S} E \cdot S \cdot I \right| E \cdot S \cdot I$$

Un exemple est illustré en **Figure 63C**, avec l'effet de l'Ac-VDVAD-CHO sur l'activité Cathepsine B. La représentation de Dixon, permet d'obtenir directement la valeur du Ki, qui

se trouve être le point d'intersection des droites. Ces deux composés inhibent donc la Cathepsine B assez efficacement, notamment le composé Ac-DEVD-CHO avec un Ki de 2 μ M.

Sur la Cathepsine L, seul le Q-VD-OPh a un effet avec une IC₅₀ de 4,9 \pm 0,4 μ M. Cependant en terme de pouvoir inhibiteur, le composé est relativement peu efficace avec un rapport de 39,8 M⁻¹.S⁻¹. Pour les inhibiteurs réversibles, seul l'Ac-DEVD-CHO est reconnu par la Cathepsine L, avec une IC₅₀ de 14 \pm 0,5 μ M. Ici aussi, la représentation de Dixon nous a permis de statuer sur le type d'inhibition (**Figure 63D**). Contrairement à l'effet sur la Cathepsine B, l'Ac-DEVD-CHO est un inhibiteur compétitif du substrat *vis-à-vis* du site actif de la Cathepsine L, tel que sur les CASP-2 et -3. Cela est confirmé par le fait que les droites de la représentation graphique 1/Vi = f ([I]) se croisent en un point commun *au-dessus* de l'axe des abscisses. La valeur du Ki est alors donnée par la projection du point de croisement des droites sur l'axe des abscisses. L'Ac-DEVD-CHO inhibe efficacement la Cathepsine L, avec un Ki de 4,8 μ M.

Bien que les peptides aldéhydes inhibent moins efficacement les Cathepsines B et L que les CASP-2 et -3 pour lesquelles ils ont des affinités de l'ordre du nanomolaire, l'inhibition *vis-à-vis* de ces protéases à cystéine concurrentes reste puissante et constitue un réel inconvénient de ces inhibiteurs dans un contexte cellulaire, où les doses utilisées sont de l'ordre du μ M. Pour les inhibiteurs Emricasan et Q-VD-OPh, nous avons pu démontrer que l'efficacité est relativement faible sur les Cathepsines. Enfin, nous avons pu valider que le composé halométhyl-cétone, z-VAD(*O*Me)-fmk a un effet croisé sur la Cathepsine B, avec un pouvoir non négligeable.



Figure 63. Effet inhibiteur des inhibiteurs de première génération sur les cathepsines.

(A) Tableau récapitulatif des constantes cinétiques Ki (B – C) Mécanismes d'inhibition des CASP-2 (B) et -3 (C) par le peptide aldéhyde Ac-VDVAD-CHO. Représentations de Lineweaver-Burk (gauche) et tracés secondaires correspondant (droite) pour l'inhibiteur compétitif Ac-VDVAD-CHO. (B) [Ac-VDVAD-CHO] CASP-2 = 0 (o) ; 3,125 (\diamond) ; 6,25 (\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 25 (\diamond) ; 50 nM (\diamond). (C) [Ac-VDVAD-CHO] CASP-3 = 0 (o) ; 6,25(\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 20 nM (\diamond). Les activités des CASP-2 et 3 sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC et Ac-DEVD-AMC en fluorescence à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 1 mg/mL de BSA ; pH 7,4. [Ac-VDVAD-AMC]_0 : 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µM et [Ac-DEVD-CHO]_0 : 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 µM. Les expériences ont été réalisées 2 fois en duplicata (erreur < 10%).

III. Inhibiteurs sélectifs des Caspases du groupe II

A. Présentation de la série

En 2003, afin de développer un inhibiteur préférentiel des caspases du groupe II (CASP-2,

-3, -7), l'équipe de Jacotot E. et ses collègues, ont combiné les extrémités amino- et carboxyterminales de l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh au motif -VDVAD-, préférentiellement

reconnu par la CASP-2. Dans le but d'améliorer l'efficacité du composé in vivo, des groupements méthyles ont été greffés sur les chaînes latérales des résidus Asp, pour former des méthyl-esters. Le dérivé pentapeptidique résultant de cette conception rationnelle est le Q-VD(OCH3)VAD(OCH3)-OPh, baptisé TRP601. Dans leur étude, Chauvier D. et al., 2011, ont également démontré l'efficacité du métabolite déméthylé du TRP601, nommé ∆2Me-TRP601 (Q-VDVAD-OPh), à inhiber l'activité des CASP-2 et -3 in vitro. Ce composé était un point de comparaison intéressant car, ayant démontré une efficacité notable dans quatre modèles animaux de lésions cérébrales néonatales, il a fait l'objet d'un développement préclinique complet (Chauvier et al, 2011). Au cours de la thèse nous avons réévalué ces composés du point de vue enzymologique et comparé l'efficacité de ces composés au composé Ac-D(OCH3)EVD(OCH3)-OPh appelé TRP901. La structure des trois composés est présentée en Figure 64. Comme mentionné plus haut, les trois molécules sont construites selon le même rationnel, un groupement carboxy-quinolyl- en N-ter et un groupement électrophile difluorophénoxyméthyl-cétone en P1'. Ces extrémités encadrent les motifs préférentiellement reconnus par les CASP-2 et -3.





B. Hiérarchisation de l'effet au vu des valeurs IC₅₀

Les valeurs des IC₅₀ obtenues sur chaque composé *vis-à-vis* des deux Caspases sont référencées dans le tableau en **Figure 65**. Ces molécules inhibent les deux Caspases avec des valeurs de l'ordre du nanomolaire, voire sub-nanomolaire pour le métabolite déméthylé. Sur cette dernière, de manière attendue le composé TRP901 contenant le motif

préférentiellement reconnu par la CASP-3, DEVD, semble 10 fois mieux reconnu que le composé TRP601 sur la CASP-3 avec des IC₅₀ de respectivement 2,96 ± 0,10 et 29,9 ± 1,2. En revanche, *in vitro*, l'absence des méthyl-esters semble favoriser la reconnaissance des inhibiteurs par les enzymes puisque le Δ 2Me-TRP601, semble mieux reconnu que le TRP901 au vu des valeurs des IC50. Pour la CASP-2, les résultats sont aussi cohérents puisque le composé avec le motif VDVAD est 7 fois mieux reconnu que l'équivalent DEVD. Enfin, le métabolite déméthylé Δ 2Me-TRP601, semble être fortement reconnu par les deux Caspases avec des IC₅₀ au subnanomolaire.

Au vu des IC₅₀, l'association des extrémités amino et carboxy terminales de l'inhibiteur pan-caspase, aux motifs préférentiellement reconnu par les Caspases du groupe II, semble augmenter de manière significative la reconnaissance des molécules par ces Caspases *in vitro*.

	IC₅₀ CASP-2 (nM)	IC₅₀ CASP-3 (nM)
TRP-901	419,8 ± 17,6	$\textbf{2,96} \pm \textbf{0,1}$
TRP-601	$\textbf{59,8} \pm \textbf{0,9}$	$\textbf{29,9} \pm \textbf{1,3}$
Δ 2Me-TRP-601	0,53 ± 0,02	$\textbf{0,31}\pm\textbf{0,01}$



C. Quantification des paramètres cinétiques de l'inhibition et efficacité des composés

En termes de mécanisme d'inhibition, ces trois composés agissent comme l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh, puisqu'ils possèdent également le bon groupe partant difluorophénol. Il s'agit donc d'inhibiteurs qui conduisent à une inactivation irréversible des CASP-2 et -3. Sans analyses structurales, les mécanismes d'action proposés sont les mêmes que ceux supposés pour les inhibiteurs irréversibles généraux.

Les études des paramètres cinétiques des inhibiteurs ont été effectuées et les résultats sont regroupés dans le Tableau en **Figure 66A**. Les deux méthodes employées pour la quantification des pouvoirs inhibiteurs sont présentées en **Figures 66B-E**, les valeurs des constantes de vitesse d'inactivation, k_{obs} sont obtenues à partir du graphique f (temps) = R.F.U pour le composé Δ 2Me-TRP601 sur les CASP-2 et CASP-3 (**Figures 66D et E**) tandis qu'elles sont obtenues à partir des pentes de la représentation graphique du ln (% activité résiduelle)

= f (temps) pour le composé TRP601 sur les deux Caspases (**Figures 66B et C**). Les valeurs des paramètres k_{inact} et K_I sont obtenues à partir du tracé k_{obs} = f ([I]).

Les valeurs obtenues pour les paramètres cinétiques et les efficacités d'inactivation kinact/KI viennent corroborer les suppositions faites sur la base des IC₅₀. Sur la CASP-3, comme attendu, le TRP901, avec son motif DEVD méthylé sur les chaînes latérales des Asp, a une plus forte affinité que son homologue VDVAD, avec un K_I de 7,87 \pm 1,9 nM par rapport à 147,6 \pm 13,2 nM. Ces différences se traduisent par un pouvoir inhibiteur 10,5 fois supérieur à celui du TRP601. En revanche, le métabolite déméthylé Δ 2Me-TRP601, est encore plus affin pour la CASP-3 avec un K_I de l'ordre du sub-nanomolaire (0,89 \pm 0,09 nM). Il s'agit donc d'un excellent inactivateur de la CASP-3 avec une efficacité de l'ordre du million, 1.640.010 M⁻¹.s⁻¹. Pour la CASP-2, la hiérarchie établie à partir des IC₅₀ est conservée. En effet, le composé TRP901, avec le motif tétrapeptidique, est le moins bien reconnu avec une affinité de l'ordre du micromolaire (2,1 \pm 0,3 μ M). La présence du pentapeptide VDVAD permet d'atteindre un K₁ de 569 \pm 10 μ M qui se traduit par une efficacité 4,5 fois supérieure au TRP901. Enfin, l'absence des méthyl-ester améliore considérablement l'affinité pour l'enzyme et surtout l'efficacité inhibitrice, puisque le pouvoir inhibiteur est augmenté de 238 fois sur la CASP-2. Comme sur la CASP-3, le Δ 2Me-TRP601 est un excellent inactivateur de la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 1.275.923 M⁻¹.s⁻¹.

Cette conception rationnelle a permis d'augmenter considérablement l'efficacité des composés en faveurs des Caspases du groupes II (-2, -3 et -7). De plus, pour le composé Δ 2Me-TRP601 aucun effet croisé sur Cathepsines n'a pu être mis en évidence dans nos conditions expérimentales (*Résultats non présentés*). Toutefois, si l'on s'approche de notre objectif en inhibant que les Caspases du groupe II, nous sommes encore loin, à ce stade, de l'inhibition préférentielle de la CASP-2, puisque le composé est aussi puissant, voire davantage puissant sur la CASP-3 que sur la CASP-2. Encore une fois, la présence du motif VDVAD ne semble pas avoir d'effet sur la sélectivité au sein du groupe II.

224



Cinétiques d'inactivation des CASP-2 et -3 par les inhibiteurs des Caspases du groupes II. Figure 66. (A) Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques. (B et C) Courbes semi-logarithmiques de l'activité résiduelle des CASP-2 et -3 (0,2 et 0,1 nM respectivement) mesurées à différents intervalles de temps pour des concentrations croissantes en TRP601. Sont accolées les représentations des constantes de pseudopremier ordre k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur qui permettent d'obtenir les paramètres k_{inact} et K_I. (B) [TRP601] sur CASP-3 : 100, 50, 25, 12,5 ; 6,25 ; 0 nM (C) [601] sur CASP-2 : 500, 250, 125, 62,5 , 31,25; 0 nM. (**D et E**) Cinétique d'inactivation des CASP-2 et -3 par le composé Δ 2Me-TRP601 mise en évidence par les cinétiques de la méthode Continue à pH 7,4 et 37°C. La libération du produit en unité arbitraire de fluorescence (RFU) est suivi au cours du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteur. Sont accolés les graphiques secondaires permettant la détermination du rapport k_{inact}/K_{I} . Les expériences ont été réalisée 5 fois (erreur < 7 %). (D) [Δ 2Me-TRP601] sur CASP-3 : 0 ; 2,5 ; 1,25 ;0,625 ; 0,312 ; 0,15625 nM (E) [Δ 2Me-TRP601] sur CASP-2 : 0 ; 5 ;2,5 ; 1,25 ;0,625 ; 0,312 ; 0,15625 nM. Les activités des CASP-2 et 3 sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 µM) et Ac-DEVD-AMC (10 μM) en unité de fluorescence arbitraires (RFU) à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1 mg/mL de BSA; pH 7,4

D. Efficacité des molécules dans le modèle d'apoptose

L'effet des composés a ensuite été évalué dans le modèle d'apoptose sur lignées HeLa. Un contrôle avec le composé Q-VD-OPh à 30 µM est systématiquement effectué. Dans ce modèle nous avons donc pu montrer que les composés TRP601 (**Figure 67A**) et son métabolite déméthylé (**Figure 67B**) protègent de manière dose dépendante la mort cellulaire induite par la Vincristine dans les cellules HeLa. L'effet avec le TRP601 est légèrement plus prononcé du fait de l'augmentation de la durée de vie du composé dans le milieu. Toutefois, contrairement

au Q-VD-OPh cet effet est beaucoup plus modéré puisqu'à 60 μ M les deux composés protègent de la mort à environ 60 %.



Figure 67. Les composés TRP601 et son métabolite déméthylé permettent de diminuer de manière dose dépendante la mort induite par la Vincristine dans les cellules HeLa.

(A) Effet protecteur de l'inhibiteur irréversible TRP601 et de (B) Δ 2Me-TRP601 sur la mort cellulaire induite par la Vincristine à 20 nM pendant 48h heures. La mort est représentée en ordonné par le pourcentage de cellules positives au PI en fonction de doses croissantes (3, 10, 30, 60 μ M) d'inhibiteurs.

E. Cytotoxicité sur des cultures primaires de neurones du Cortex

Sur les cultures de neurones corticaux, seul l'effet du composé Δ 2Me-TRP601 a été évalué.

Les résultats sont présentés en Figure 68 et montrent que le composé, à 100 µM ne présente

aucune toxicité sur les neurones tandis que la roténone à 50 µM induit la mort à plus de 95 %.



Figure 68.Le composé Δ 2Me-TRP601 ne présente aucune toxicité sur lescultures de neurones primaires du Cortex.Les expériences ont été réalisées 3 fois(erreur < à 7%).</td>

IV.En route vers la sélectivité

A. Contexte

Dans le cadre d'une étude réalisée dans le contexte de la maladie de Huntington, Maillard M.C. et ses collègues en 2011, ont souhaité développer des inhibiteurs préférentiels de CASP-2 avec une activité réduite sur la CASP-3. Ce travail a été réalisé dans le but de conclure quant à l'implication des CASP-2 et -6 dans le clivage cytotoxique de l'Huntingtine *in vitro* et dans des modèles animaux.

Grâce à l'étude précise de la topologie des sites actifs des CASP-2 et -3, ils ont pu concevoir selon une approche de conception rationnelle, des inhibiteurs réversibles avec un effet préférentiel sur la CASP-2. Les structures, représentées en surface, des sites actifs des deux Caspases sont présentées en **Figures 69A et B**.

Plus précisément, l'étude de la structure des sites actif a révélé que la seule différence entre les deux enzymes résidait en deux points au niveau du sous-site S₂. À ce niveau, la différence notable est le remplacement de la Tyr-204 de la CASP-3 par l'Ala-228 dans le site actif de la CASP-2. De plus, la Phe-279 de CASP-2 est décalée de 3 Å (Phe-256) ce qui l'enfouis davantage dans la poche S₂ de CASP-3. Par conséquent, le décalage de la Phe-256 et surtout la présence de la Tyrosine forment un sillon étroit au niveau de la CASP-3 tandis que le sous-site S₂ forme une cuvette pour la CASP-2. Sur cette base, ils ont alors proposé qu'un groupement encombrant en position P2 d'un motif pentapeptide VDVAD-CHO (**Figure 69C**), pourrait facilement s'accommoder au niveau du S₂ de CASP-2 tandis qu'une gêne stérique aurait un effet délétère sur la fixation d'un tel peptide au niveau du site actif de la CASP-3. Au cours de la thèse, nous nous sommes proposés de valider cette théorie dans nos tests enzymologiques et d'étudier les mécanismes d'action de ces potentiels nouveaux inhibiteurs de CASP-2.



Figure 69. Conception de nouveaux inhibiteurs à partir des données cristallographiques obtenues sur la structure du sous-site de liaison S_2 des CASP-2 et -3.

(A et B) Les surfaces, colorées en doré, du site actif de la CASP-3 (A), code PDB : 2DKO) et de la CASP-2 ((B)code PDB : 1PYO). (C) Structure générique des inhibiteurs pentapeptides aldéhydes (P5–P4–P3–P2–P1– CHO) reconnus par les sous-sites S1-S5 du site actif. D'après Maillard M.C. *et al.*, 2011.

B. Présentation des composés

Les structures des composés retenus pour notre étude sont présentées en **Figure 70**. Les 4 molécules sont des peptides aldéhydes contenant le motif de référence VDV(X)D, dont l'extrémité a été cyclisée pour prévenir de la dégradation dans un contexte cellulaire. Les

molécules diffèrent de par la nature du maillon organique en P2. En effet, les molécules c33, k33 et h33, sont toutes des dérivés de (S)-Proline. C33 est un analogue 3-(S)-isopropoxy tandis que pour h33 la (S)-proline est substituée en position 3 avec un néopentyl ; Enfin, k33 a un cyclohexyl directement lié à la position 3 de la (S)-Proline. q33 en revanche présente une isoquinoline avec l'introduction d'un groupement méthyle sur le carbone-7.



Figure 70. Structure des composés issus de l'étude structurale comparative des sous-sites du site actif des CASP-2 et -3.

Les composés ont été obtenu dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Maillard (CHDI) et ont été choisi parmi une série chimique plus vaste, et sur la base des évaluations préliminaires enzymologiques et cellulaires qui avaient été publiées par l'équipe de MC Maillard (Maillard M.C. *et al.*, 2011). Les positions des substitutions sont indiquées en rouge en gras.

C. Hiérarchisation de l'effet et mécanisme d'action

Les valeurs des IC₅₀ obtenues pour chaque composé sont référencées dans le tableau en **Figure 71A**. Au vu de ces valeurs, le premier constat qui peut être fait est que la présence d'un groupement encombrant en position P2 sur le motif de référence VDVAD semble accroître la sélectivité en faveur de la CASP-2 dans nos tests de cinétiques enzymatiques *in vitro*. En effet, ces quatre molécules ont des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire sur la CASP-2 tandis que sur la CASP-3 les effets sont de l'ordre du micromolaire. De plus, la hiérarchie des effets *vis-à-vis* de ces deux enzymes est totalement différente puisque le composé **h33** qui a la meilleure IC₅₀ sur la CASP-2 (11,2 ± 0,6 nM) est le plus faiblement reconnu par la CASP-3 (6,5 ± 1,9 µM). Et inversement, le composé **k33**, qui compte tenu des valeurs IC₅₀ semble être le mieux reconnu par la CASP-3 avec une IC₅₀ de 1,9 ± 0,87 est avec **c33** le composé le bien moins reconnu par la CASP-2 avec une IC₅₀ de 196,6 ± 12,8 nM. Pour les deux Caspases, le composé **q33** occupe la même place dans le classement de reconnaissance, puisque c'est dans les deux cas le

deuxième composé le mieux reconnu. Toutefois, bien qu'il occupe cette deuxième place du classement, l'effet est 140 fois supérieur sur la CASP-2 avec une IC_{50} de 17,7 ± 1,5 nM.



Figure 71. Les composés c33, k33, h33 et q33 inhibent de manière réversible la CASP-2 avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire.

(A) Tableau récapitulatif des données IC₅₀ obtenues sur les CASP-2 et -3. (B) Mise en évidence de la réversibilité de l'inhibition par la méthode de dilution. [h33/q33] = 250 nM avant dilution et [c33/k33] = 4 μ M avant dilution. L'activité CASP-2 (0,2 nM) est mesurée pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μ M) en unité de fluorescence arbitraires (RFU) par minute à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4.

En termes de mécanismes d'inhibition, comme leurs prédécesseurs, ils agissent en établissant un lien covalent transitoire avec la cystéine catalytique, ce qui induit une inhibition réversible de l'activité enzymatique. Ce mécanisme est confirmé par les résultats illustrés en **Figure 71B**, où suite à une dilution au 100^e des complexes E/I pour chacune des molécules, l'activité de CASP-2 en l'occurrence, est restituée à plus de 50 %.

D. Type d'inhibition et quantification des paramètres cinétiques

Comme pour la caractérisation des peptides aldéhyde de première génération, la méthode de compétitivité avec le substrat afin d'obtenir le Ki est utilisée, qui rend compte de l'efficacité inhibitrice. La représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk nous permet d'obtenir au travers d'un graphique secondaire, les valeurs de ces constantes pour chaque inhibiteur. Tout d'abord, sur les deux enzymes, les quatre molécules agissent en inhibiteurs compétitifs du substrat pour la fixation au site actif. Ces résultats sont illustrés avec l'effet du composé **h33** sur les CASP-2 et -3 présentés en Figure **72B et C**. En effet, la représentation en doubles inverses nous révèle que les droites se croisent en un même point au niveau de l'axe des ordonnées. Pour toutes ces molécules, un excès de substrat va donc permettre de lever l'inhibition.

Les valeurs des constantes Ki, présentées en **Figure 72A** viennent corroborer les résultats obtenus avec les IC₅₀. En effet, les efficacités sont aussi de l'ordre du nanomolaire sur la CASP-2 et du micromolaire sur la CASP-3. La hiérarchie des inhibiteurs sur la CASP-2 est conservée,

229

puisque **h33** qui avait la meilleure IC₅₀ sur la CASP-2 est également celui qui a la meilleure affinité avec un Ki de 10,9 nM. De manière plus qu'intéressante il est également celui qui a le moins d'effet sur le CASP-3 avec un Ki de 6,5 μ M, soit un différentiel de 597 en faveur de la CASP-2. Le composé q33 est finalement le composé le plus efficace sur la CASP-3 avec un Ki de 2,3 μ M, mais il est toujours 85 fois moins efficace que sur la CASP-2 avec un Ki de 26,7 nM. Enfin, les composés c33 et k33 bien qu'aussi efficaces avec des Ki de respectivement 122 et 90,5 nM sur CASP-2 et 2,4 et 2,7 μ M sur CASP-3 ne parviennent pas à rivaliser avec les index de sélectivité de q33 et surtout de h33.

Le *design* de ces peptides à partir de l'étude des structures des sites actifs est donc totalement validé dans nos tests. Pour la première fois on atteint des index de sélectivité de presque 600 en faveur de la CASP-2.



Figure 72. Les inhibiteurs h33 et q33 sont des inhibiteurs réversibles compétitifs efficaces des CASP-2 avec une reconnaissance modérée par la CASP-3.

(A) Tableau récapitulatif des constantes cinétiques Ki obtenues sur chaque composé sur les deux Caspases (B – C) Mécanismes d'inhibition des CASP-2 (B) et -3 (C) par le peptide aldéhyde h33. Représentations de Lineweaver-Burk (gauche) et tracés secondaires correspondant (droite) pour l'inhibiteur compétitif h33. (B) [h33]_{CASP-2} = 0 (o) ; 6,25 (\diamond) ; 12,5 (\diamond) ; 25 (\diamond) ; 50 (\diamond) ; 100 nM (\diamond). (C) [h33]_{CASP-3} = 0 (o) ; 2,5 (\diamond) ; 5 (\diamond) ; 10(\diamond) ; 20 (\diamond) ; 40 µM (\diamond). Les activités des CASP-2 et 3 sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC et Ac-DEVD-AMC en RFU/min à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 1 mg/mL de BSA ; pH 7,4. [Ac-VDVAD-AMC]₀ : 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µM et [Ac-DEVD-CHO]₀ : 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 µM. Les expériences ont été réalisées 2 fois en duplicata (erreur < 10%).

E. Effet des molécules dans un contexte cellulaire

Afin de voir si les quatre composés étaient aussi efficaces sur cellules que dans nos tests de cinétiques enzymatiques, nous avons évalué leurs effets dans le modèle cellulaire

d'apoptose sur lignées HeLa. Les résultats obtenus avec les différentes molécules sont présentés en **Figures 73A et B**, avec en référence l'inhibiteur irréversible pan-Caspase Q-VD-OPh à 30 μ M. Dans ces conditions expérimentales, les composés **c33** et **k33** ne parviennent pas, même à 60 μ M, à prévenir de la mort cellulaire induite par 20 nM de Vincristine pendant 24h (**Figure 73A**). En revanche, les composés **q33** et **h33** et surtout **q33** à 60 μ M diminue à plus de 50 % la mort induite par la Vincristine dans les cellules HeLa. Pour le composé h33, l'effet est plus modéré mais il arrive tout de même à une dose de 60 μ M à réduire environ 50 % de la mort (**Figure 73B**). Toutefois, pour ces inhibiteurs, aucun effet dose n'a pu être mise en évidence.

Il est à noter que la cinétique de mort se fait sur un temps long 24h à 48h et que les inhibiteurs **q33** et **h33** sont des inhibiteurs réversibles qui peuvent être dégradé au cours de cet intervalle de temps. Tandis que l'effet du Q-VD-OPh et des autres inhibiteurs irréversibles, dépendant seulement du *turn-over* de l'enzyme dans les cellules HeLa.



Figure 73. Les composés h33 et q33 réduisent de 50 % à 60 µM la mort cellulaire induite par la Vincristine dans les cellules HeLa.

(A) Évaluation par cytométrie en flux de l'effet cytoprotecteur des composés c33 et k33 et (B) q33 et h33 sur la mort cellulaire induite par la Vincristine à 20 nM pendant 24 heures, représentée en ordonnée par le pourcentage de cellules positives au PI en fonction de doses croissantes (3, 10 et/ou 30, 60 μ M) en inhibiteurs.

F. Évaluation de la toxicité de h33 sur culture primaire de neurones corticaux

Enfin, le composé **h33** ne présente aucune toxicité *vis-à-vis* des cultures primaires de neurones corticaux même à une concentration de 100 μ M (**Figure 74**).



Figure 74.Le composé h33 ne présente aucunetoxicité sur les cultures de neurones primaires.Le composé h33 ne présentent aucune toxicité à 100 μ M tandis que la roténone à 30 μ M cause la mort àplus de 95 %. Les expériences ont été réalisées 2 fois(erreur < à 7%).</td>

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que les composés **h33** et **q33** sont très actifs dans les tests enzymatiques *in vitro* et inhibent fortement la CASP-2 avec des effets plus que modérés sur la CASP-3. De plus, ils ont tout de même démontré un effet cytoprotecteur dans le test cellulaire d'apoptose. Enfin, le composé **h33** ne semble pas être toxique, puisqu'à 100 µM la survie des neurones demeure intacte.

V. Un long chemin vers la sélectivité

Jusqu'ici, les données obtenues avec les inhibiteurs réversibles h33 et q33 ont ouvert la voie à une sélectivité en faveur de la CASP-2. De plus, le Δ 2Me-TRP601 bien que non sélectif de la CASP-2 est un inhibiteur très efficace de cette enzyme. Enfin, la capacité du TRP601 à traverser la barrière hémato-encéphalique comme ont pu le mettre en évidence Chauvier D. *et al.*, en 2011, associée à l'absence de toxicité du groupement partant difluorophénol *in vivo*, rendent ce composé très intéressant du point de vue outil pharmacologique et développement dans le contexte des pathologies neurologiques.

En associant tous ces éléments, une nouvelle série de molécules issue d'une conception rationnelle a été proposée par Etienne Jacotot et ont fait l'objet de deux dépôts de brevets (2015 et 2016) par l'Inserm et Université Paris 7 (Diderot), dont l'un a été retiré puis redéposé en 2017, et auquel je suis associée.

En termes de structure, certaines de ces nouvelles molécules sont le résultat de l'association des groupes carboxy-quinolyl et fluorophenoxy-methyl-cetone du Δ 2Me-TRP601 et des synthons de la position P2 des composés **h33** et **q33**.

Le travail réalisé autour de ces molécules a été parsemé d'embûches et dans cette partie consacrée à leurs études, nous allons retracer l'histoire de ces molécules qui nous ont finalement donné grande satisfaction.

233

A. Premiers pas vers la sélectivité avec LJ2

1. Structure et quantification des premiers effets sur les Caspases-2 et -3.

L'histoire de la série « LJ » débute avec le premier composé synthétisé, le **LJ2**. La structure de ce dernier est présentée en **Figure 75A**. Finalement, le **LJ2** n'est pas une molécule mais un mélange de deux diastéroisomères en position P2. Cet inhibiteur se construit en trois parties, l'extrémité N-ter, carboxy-quinoline de l'inhibiteur pan-Caspase, suivi d'un motif pentapeptide VDV(X)D suivi d'un groupement électrophile difluorophénoxyméthyl-cétone. L'Ala du motif VDVAD est remplacée par l'isoquinoline fonctionnalisée avec un groupement méthyle porté par le carbone-7 de l'inhibiteur q33.

Les valeurs des IC₅₀ pour le composé **LJ2** sont regroupées dans le tableau en **Figure 75B**. Compte tenu des valeurs IC₅₀, **LJ2** semble avoir un profil d'inhibition intéressant avec une inhibition préférentielle de la CASP-2 caractérisée par une IC₅₀ de l'ordre du sub-nanomolaire (0,37 \pm 0,01 nM). Tandis que la CASP-3 semble être 350 fois moins reconnue avec une IC₅₀ de 140,3 \pm 5 nM.





2. Quantification des paramètres cinétiques

Cet inhibiteur, comme le TRP601 et Δ 2Me-TRP601 est un inhibiteur irréversible des CASP-2 et -3. Les valeurs des constantes cinétiques sont regroupées dans le tableau en **Figure 76A**. Les résultats bruts des cinétiques des méthodes « Continues » obtenues pour ce composé à différentes concentrations sur les CASP-2 et -3 ainsi que les graphiques secondaires

qui nous ont permis d'obtenir le rapport k_{inact}/K_I sont présentés en **Figure 76B et C**. Si l'écart entre les valeurs des IC₅₀ était significatif, celui entre les valeurs des K_I est nettement moins important. En effet, bien que l'inhibiteur ait plus d'affinité pour la CASP-2 avec un K_I de 3,4 ± 0,9 nM, l'affinité pour la CASP-3 n'en demeure que 15 fois inférieure avec un K_I de 50,8 ± 3,4 nM. Ce faible écart d'affinité influence nettement la sélectivité bien que le composé LJ2 soit très puissant sur la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 1.246.922 M⁻¹.s⁻¹. En effet, l'index de sélectivité n'est que de 22 avec un rapport k_{inact}/K_I de 57 342 sur la CASP-3.



Figure 76. Le composé LJ2 est un très puissant inactivateur de la CASP-2 mais il inhibe aussi efficacement la CASP-3

(A) Tableau récapitulatif des constantes cinétiques obtenues pour LJ2 sur les CASP-2 et -3 (**B et C**) Cinétiques d'inactivations des CASP-2 et -3 par le composé LJ2 mises en évidence par les cinétiques de la méthode Continue à pH 7,4 et 37°C. La libération du produit en unité arbitraire de fluorescence (RFU) est suivie au cours du temps en présence de concentrations croissantes en LJ2. Sont accolés les graphiques secondaires permettant la détermination du rapport k_{inact}/K_I . Les expériences ont été réalisée 5 fois (erreur < 7 %). (**B**) [LJ2] sur CASP-3 : 100 ; 40 ; 16 ; 6,4 ; 2,56 ; 1,024 ; 0 nM (**C**) [LJ2] sur CASP-2 : 5 ;2,5 ; 1,25 ;0,625 ; 0,312 ; 0,15625, 0 nM. Les activités des CASP-2 (0,2 nM) et 3 (0,1 nM) sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μ M) et Ac-DEVD-AMC (10 μ M) en RFU/min à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1% CHAPS ;1 mg/mL de BSA ; pH 7,4.(**D**) Chemin cinétique pour les inhibiteur irréversibles.

3. Évaluation du LJ2 dans le modèle d'apoptose

Comme pour les autres inhibiteurs, après avoir validé l'efficacité du composé dans nos tests de cinétiques enzymatiques, l'effet cytoprotecteur de la molécule est évalué sur le modèle standardisé d'apoptose avec en contrôle le Q-VD-OPh qui protège de la mort à environ 90 % à 30 μ M. Les résultats de cette expérience sont présentés en **Figure 77A**. Dans ce modèle, le composé **LJ2** protège de manière dose-dépendante de la mort induite par la vincristine dans les cellules HeLa. Plus précisément, à 60 μ M, le composé bloque à 60 % la mort cellulaire. Toutefois, l'effet à 60 μ M est deux fois moins efficace que le Q-VD-OPh à une concentration deux fois plus faible.

Enfin, la toxicité du composé **LJ2** est évaluée sur cultures de neurones corticaux primaires. Les résultats de cette étude sont présentés en **Figure 77B**. Les données montrent que le composé n'est pas toxique sur les neurones corticaux. À 100 μ M le composé semble présenter une toxicité qui s'élève à environ 20 %.



Figure 77. Effet du composé LJ2 dans le modèle d'apoptose et évaluation de la toxicité sur des cultures de neurones primaires.

(A) Le composé LJ2, à 60 μ M, protège de manière dose-dépendante, à 50 % de la mort induite par la Vincristine dans les cellules HeLa. (B) LJ2 ne présente pas de toxicité vis-à-vis des cultures de neurone primaires tandis que la roténone induit à plus de 95 % la mort cellulaire. Expériences réalisée 3 fois (erreur < 5%)

Finalement, avec cette première molécule, nous avons un composé aussi efficace sur la CASP-

2 que le composé initial \triangle 2Me-TRP601 mais avec un index de sélectivité supérieur (1,5 \rightarrow 22)

avec toutefois une la sélectivité moindre que celle du composé h33.

La synthèse des molécules suivantes a été fortement retardée et pour cause, les maillons

organiques stéréospécifiques des composés h33 et q33 n'étaient pas commercialisés. La

synthèse a finalement pu être débloquée et les molécules ont été réceptionnées et les tests initiés en Janvier 2018.

B. Peptides Inhibiteurs stéréospécifiques réversibles

1. Présentation des molécules

L'histoire se poursuit avec les molécules **LJ4a**, **LJ4b** et **LJ5a** et **LJ5b**. Les structures de ces composés sont présentées en **Figure 78**. Les quatre molécules, comme le **LJ2** sont construites en trois parties, une portion N-ter avec un acétyle, un motif pentapeptidique central VDV(X)D suivi d'un groupement électrophile thiazozylméthyle en P1' qui n'est autre que l'extrémité C-ter de l'antirétroviral, Ritonavir. Au cours de la synthèse chimique, chacun des inhibiteurs est synthétisé sous forme d'un mélange de 2 stéréoisomères sur la position P2. En conséquence, les stéréoisomères a et b de chaque molécule ont été isolés. Le composé **LJ4**, tout comme le composé **LJ2** possède en position P2 l'isoquinoline fonctionnalisée avec un groupement méthyle sur le carbone-7. Le composé LJ5, en revanche, possède une (S)-proline substituée en position 3 avec un néopentyl.



Figure 78. Structures des stéréoisomères LJ4 a et B et LJ5 a et b.

Les extrémités amino et carboxy-terminales sont indiquées respectivement en bleu et rouge et la configuration des carbones asymétriques est indiquée entre parenthèses.

2. Études mécanistiques

Les valeurs des IC₅₀ obtenues pour chaque composé sont sur les CASP-2 et -3 sont présentées dans le tableau en **Figure 79 A**. Le premier constat qui peut être fait à partir des

IC₅₀ et que la configuration du Carboneα en P2 joue un rôle crucial dans la reconnaissance des composés par les CASP-2 et -3. Si l'on considère les composés sur la CASP-2, on remarque que les IC₅₀ pour les stéréoisomères a sont de l'ordre du micromolaire et varient pour entre 1,3 ± 0,068 µM et 7,8 ± 0,2 µM pour les composés LJ4a et LJ5a respectivement. Tandis que pour les stéréoisomères b les IC₅₀ sont de 51 ± 0,5 µM et 23 ± 1 µM pour LJ4b et LJ5b. Soit une reconnaissance 39 fois supérieure du composé LJ4a par rapport au composé LJ4b. Les valeurs des IC₅₀ laissent à penser que les composés LJ4a et LJ5a semblent préférentiellement reconnus par la CASP-2 avec une IC₅₀ de 152 ± 9 µM pour le composé LJ4a sur la CASP-3 et de 24 ± 0,8 pour LJ5a. Soit un différentiel d'un facteur 116 pour le composé LJ4a en faveur de CASP-2.

Du fait de la présence du thiazozylméthyle en C-ter, les composés agissent en inhibiteurs réversibles des CASP-2 et -3. Les types d'inhibitions ont été étudiés par compétitivité et les représentations graphiques de Dixon nous ont permis de statuer sur le mode d'action de ces molécules. Les graphiques pour les composés LJ5a et LJ4a sur les CASP-2 et -3 sont représentés en Figures 79B et C. Sur la représentation de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de la concentration en inhibiteur pour des concentrations en substrats croissantes, les droites ont une intersection commune *au-dessus* de l'axe des abscisses. Par conséquent toutes ces molécules sont donc des inhibiteurs compétitifs, dont l'inhibition est levée par un excès de substrat. Les valeurs des constantes Ki, extraites de ces graphiques sont référencées dans le tableau en Figure 79A. Les effets du composé LJ4a sont 1,5 fois moins préférentiels en considérant les valeurs des Ki, puisque les valeurs sont de 2,5 µM contre 65 µM sur la CASP-3. Il s'agit donc d'un bon inhibiteur de CASP-2 avec un effet modéré sur la CASP-3. En revanche, pour le composé LJ5a, les valeurs sont surprenantes et vont à l'encontre des valeurs IC₅₀ puisque l'affinité du composé pour les CASP-2 et -3 est finalement la même.

En complément de ces résultats nous avons vérifié que le Ritonavir à 10 et 50 μ M n'a aucun effet inhibiteur sur les activités CASP-2 et -3.

238



Figure 79. Les composé LJ4a et LJ5a sont des inhibiteurs réversibles compétitifs efficaces des CASP-2 et -3. (A) Tableau récapitulation des effets inhibiteurs et des constantes d'inhibition obtenues pour chaque composé sur les CASP-2 et -3. (B et C) Représentations graphiques de Dixon pour l'inhibition compétitive des CASP-2 et -3 par les composés LJ4a et LJ5a. [Ac-VDVAD-AMC]₀ : 12,5 (\bullet) ; 50 (\bullet) ; 100 (\bullet) µM. [Ac-DEVD-AMC]₀ : 6,25 (\bullet) ; 12,5 (\bullet) ; 25 (\bullet) ; 50 (\bullet) ; 50 (\bullet) ; 00 (\bullet) µM. [Ac-DEVD-AMC]₀ : 6,25 (\bullet) ; 12,5 (\bullet) ; 25 (\bullet) ; 50 (\bullet) µM. (D) Schéma cinétique de Michaelis-Menten pour les inhibiteurs compétitifs. ni : pas d'inhibition du composé à 100 µM ; nd : expériences non réalisées compte tenu de l'absence d'effet ou de la valeur trop élevée de l'IC₅₀.

C. Peptides Inhibiteurs stéréospécifiques irréversibles

1. Présentation des molécules

L'histoire de la série LJ s'achève avec les molécules dont les structures sont regroupées en **Figure 80**. Les composés LJ2 sont les équivalents irréversibles des composés LJ4 avec l'isoquinoline en position P2 du pentapeptide VDV(X)D. Tandis que les composés LJ3 sont les équivalents irréversibles des composés LJ5. Ces molécules possèdent donc les motifs

pentapeptidiques décrit *ci-dessus* associés aux extrémités N-ter et C-ter de l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh.



Figure 80.Structures des composés irréversibles LJ2a et b et LJ3a et b.Ces composés sont les équivalents réversibles des composés LJ4 et LJ5.

2. Hiérarchisation de l'effet grâce aux données IC₅₀.

Les valeurs des IC₅₀ obtenues pour les différents composés sur les CASP-2 et -3 sont regroupées dans le tableau en **Figure 81**. Pour ces molécules la configuration du Carbone α en position P2 est importante pour la reconnaissance des composés *vis-à-vis* des deux enzymes. En effet, en considérant ces valeurs, LJ2b semble être 757 fois moins bien reconnu que le stéréoisomère LJ2a par la CASP-2. Mieux encore, le composé LJ3b serait 1390 fois moins bien reconnu que LJ3a par la CASP-2 au vu des IC₅₀. Sur la CASP-3, le constat est le même avec un différentiel d'effet de 1132 entre les composés LJ2a et 2b et de 276 entre les composés LJ3a et LJ3b.

Les composés **LJ2**a semblent être très bien reconnus par les deux Caspases avec des IC₅₀ de l'ordre du nano sur la CASP-3 (1,5 ± 0,05) et du sub-nanomolaire (0,14 ± 0,01) sur la CASP-2, avec un différentiel de l'effet d'environ 10 fois. Les composés LJ3a sont aussi très bien reconnus par les CASP-2 et -3 avec des IC₅₀ de respectivement 0,28 ± 0,01 et 59,1 ± 1,2 nM. Mais sur ce dernier composé, l'index de sélectivité sur la base des valeurs des IC₅₀ est plus qu'intéressant, avec une valeur de 211.

	IC₅₀ CASP-2 (nM)	IC₅₀ CASP-3 (nM)
LJ2a	$\textbf{0,14} \pm \textbf{0,01}$	$1,5\pm0,05$
LJ2b	$106,1 \pm 3,2$	1699 ± 23
LJ3a	$0,28\pm0,01$	$59,1\pm1,2$
LJ3b	389 ± 0,01	16300 ± 500

Figure 81. Quantification de l'effet inhibiteur de la nouvelle série d'inhibiteurs stéréospécifiques

3. Efficacités inhibitrices des composés LJ2a, LJ2b, LJ3a et LJ3b

Les mécanismes d'inhibitions des composés ont été étudiés à l'aide de la méthodes Continues. Les cinétiques obtenues pour les composés LJ2a et LJ3a sur les deux Caspases ainsi que les graphiques secondaires qui ont permis de définir les efficacités inhibitrices sont présentés en Figures 82B-E. Les paramètres cinétiques obtenus pour chaque inhibiteur sont référencés dans le tableau en Figure 82A. Les valeurs des constantes d'affinités K_I viennent corroborer les résultats des IC₅₀ puisque le composé LJ2a présente une très forte affinité de l'ordre du sub-nanomolaire sur la CASP-2 (0,9 \pm 0,1 nM) et un K₁ de 11,5 \pm 0,9 sur la CASP-3. La vitesse de l'inactivation associée à la grande affinité du composé font que le Ll2a est un inhibiteur extrêmement puissant de la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 5.499.419 M⁻¹.s⁻¹. Bien que l'inhibiteur soit moins puissant sur la CASP-3 avec une efficacité de 113 425 M⁻¹.s⁻¹, l'index de sélectivité de 48 est relativement bon, notamment pour une application cellulaire, toutefois cet index de sélectivité est encore perfectible Le stéréoisomère LJ2b est nettement moins puissant que le LJ2a sur la CASP-2 un rapport k_{inact}/K_l de 7 177 M⁻¹.s⁻¹. Ce qui confirme ici l'importance d'avoir un composé optiquement pur. Le composé LJ3b présente un bon index de sélectivité de en faveur de la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K₁ de 823 M⁻¹.s⁻¹ en comparaison au faible effet sur la CASP-3 (9,38 M⁻¹.s⁻¹). Cependant, ce composé, bien qu'il soit intéressant du point de vue du profil de sélectivité, il ne présente aucun avantage sur l'efficacité par rapport au Composé LJ2a notamment. Pour satisfaire à tous ces critères, il y a le composé LJ3a. En effet, ce composé présente une très bonne affinité pour la CASP-2 avec un K₁ de 2,8 \pm 0,8 nM, et une affinité moindre pour la CASP-3 (399,8 \pm 93,3 nM). Surtout, ce composé est 950 fois moins efficace sur la CASP-3 que sur la CASP-2. En effet, avec un pouvoir inhibiteur d'1.708.996 M⁻¹.s⁻¹ sur la CASP-2 et de seulement 1 807 M⁻¹.s⁻¹ sur la CASP-3 ce composé combine l'efficacité d'action et la sélectivité en faveur de la CASP-2, tant souhaitée.



Figure 82. Les composés Ll2a et Ll3a sont de puissants inactivateurs de la CASP-2, avec un effet plus modéré sur la CASP-3.

(A) Tableau récapitulatif des constantes cinétiques obtenues pour les 4 composés sur les CASP-2 et -3. (B et C) Cinétiques d'inactivations de la CASP-2 par les composés LJ2a et LJ3a, mises en évidence par les cinétiques de la méthode Continue à pH 7,4 et 37°C. La libération du produit en unité arbitraire de fluorescence (RFU) est suivie au cours du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteurs. Sont accolés les graphiques secondaires permettant la détermination du rapport k_{inact}/K_I. [LJ2a/3a] sur CASP-2 : 10 ; 4 ; 1,6 ; 0,64 ; 0,256 ; 0,024, 0 nM. (D et E) Cinétiques d'inactivation de la CASP-3 par les composés LJ2a et LJ3a. (D) [LJ2a] sur CASP-3 : 62,5 ; 25 ; 10 ; 4 ; 1,6 ; 0,64 ; 0 nM. (E) [LJ3a] sur CASP-3 : 1000 ; 400 ; 160 ; 64 ; 25,6 ; 10,25 ; 4,09 ; 0 nM. Les activités des CASP-2 (0,2 nM) et 3 (0,1 nM) sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μM) et Ac-DEVD-AMC (10 μM) en RFU/min à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 9H 7,4.

D. Sélectivité vis-à-vis des protéases concurrentes

Ces nouvelles molécules ont été testées à 10 μ M sur les Cathepsines B, L et D (**Figure 83A**). À une telle dose et compte tenu de l'efficacité de nos composés sur les CASP-2 et -3, aucun profil d'inhibition n'a été retenu sur ces enzymes. En revanche, le composé **LJ2** initial testé en parallèle a démontré sa capacité à inhiber la Cathepsine D *in vitro*, dans nos conditions expérimentales. Cet effet a pu être quantifié au travers de la détermination d'une IC₅₀ qui s'élève à 17 ± 0,6 μ M.

Les molécules ont également été testées sur des protéases impliquées au niveau du système nerveux central, ainsi que sur la CASP-6. Les kallicréines 1 et 8 (KLK1 et KLK8) sont étudiées au laboratoire pour leurs rôles dans les pathologies neurodégénératives, j'ai donc bénéficié des

compétences développées antérieurement sur ces protéases afin d'étudier les effets de la nouvelle série LJ. La thrombine, trypsine et la plasmine sont d'autres protéases à sérine importantes au niveau du SNC et sont également étudiées au laboratoire, ce pourquoi les molécules ont été également testées sur leurs activités. Enfin, la CASP-6 est la seule autre Caspase pour laquelle des conditions optimales de cinétiques enzymatiques ont pu être déterminée. Les résultats de cette sélectivité sont présentés en Figure 83B. Les IC₅₀ et rapports k_{inact}/K₁ pour les inhibiteurs irréversibles et les valeurs des K_i pour les composés réversibles sont regroupé dans le tableau en Figure 83C. Aucune molécule n'a été retenue sur les activités KLK1, Thrombine, Trypsine et Plasmine. En revanche, sur l'activité CASP-6, même le composé TRP-604 a démontré un fort potentiel inhibiteur avec une IC₅₀ de 64 \pm 6 nM. Pour ce composé, le mécanisme d'inhibition a été étudié et l'efficacité inhibitrice déterminée à l'aide de la méthode continue permettant ainsi d'obtenir un rapport de 4.706 M⁻¹.s⁻¹. Le premier LJ2 est aussi un inhibiteur de la CASP-6 avec une IC_{50} de 8,4 \pm 0,7 μ M. Le mécanisme n'a pas été étudié pour cette molécule. Le composé LJ2a a également montré une inhibition de l'activité CASP-6 à 10 μ M. L'IC₅₀ a alors été déterminée et s'élève à 5,3 \pm 0,3 μ M. Le mécanisme d'inhibition par la méthode continue a révélé que le composé était peu efficace sur cette enzyme avec un rapport k_{inact}/K_I de 14 M⁻¹.s⁻¹. Enfin, le composé LJ5a présentait également un profil d'inhibition à 10 µM sur l'activité CASP-6. L'IC₅₀ et le mode d'action de ce composé ont été étudiés. Ainsi, **LJ5a** inhibent la CASP-6 avec une IC₅₀ de 11,3 \pm 1 μ M et agit en inhibiteur compétitif du substrat pour la fixation au site actif de l'enzyme. Sur la kallicréine 8, nous avons également pu mettre en évidence que le premier composé LJ2, inhibe son activité avec une IC₅₀ de 19 \pm 0,7 μ M. Les composés h33 et q33 ont été également testés sur l'activité Cathespine et aucun effet croisé n'a été mis en évidence à 10 µM (*Résultats non présentés*).

RESULTATS PARTIE 1



Figure 83. Étude de la sélectivité de la nouvelle série de composé sur un panel de protéases concurrentes dans le système nerveux central.

(A) Profil d'inhibition des Cathepsines D, L et B par les composés à 10 μ M de la nouvelle série. (B) Profil d'inhibition de protéases à Sérine concurrentes dans le CNS par les composés de la nouvelle série à 10 μ M. Les contrôles de l'inhibition (CTRL) sont représentés en blanc. (C) Tableau récapitulatif des IC₅₀ et des paramètres cinétiques obtenus pour les inhibiteurs qui présentaient un profil d'inhibition intéressant (à 10 μ M, une inhibition supérieure ou égale à 50 %) vis-à-vis des CASP-6, Cathepsine D et KLK 8.

RESULTATS - PARTIE II -

CASPASE-2 ET MALADIE D'ALZHEIMER

I. Pathogénicité du peptide β-amyloïde

A. Préambule

Comme nous avons pu le voir en Introduction la CASP-2 à un rôle dual dans la pathogénicité du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer. D'une part, elle pourrait être activée par l'AB à des stades précoces caractérisés par une perte synaptique au niveau de la voie perforante (réseaux neuronal Cortex \rightarrow Hippocampe). D'autre part, elle agirait en médiateur proximal de la neurotoxicité du peptide amyloïde. Afin d'étudier son rôle au niveau de la synapse suite à une induction de la perte synaptique avec des oligomères d'A β_{1-42} nous avons utilisés des dispositifs microfluidiques qui sont développés au laboratoire. Les deux modèles de puces utilisées sont présentés en partie « Matériels & Méthodes ». Nous avons établi des cultures des neurones embryonnaires (E16) de l'hippocampe dans des chambres microfluidiques en PDMS qui permettent une qualité et durée améliorées des cultures de neurones. Ces chambres microfluidiques, appelées «8C» (en référence au nombre de chambres par par dispositif) ont été développées en collaboration entre notre laboratoire et la société MicroBrain Biotech. L'utilisation de ces systèmes microfluidiques présente une série d'avantages : (1) la culture des neurones et éventuellement cellules gliales a lieu dans une chambre de très faible volume (volume = 250 nanolitres ; hauteur de la colonne de milieu = 50 µm) ce qui permet un confinement plus proche de la physiologie, et une moindre dilution des facteurs de croissance et des autres agents sécrétés dont l'effet est paracrine, (2) le polydimethylsiloxane (PDMS) qui constitue les paroi des chambres est un polymère perméable aux gaz ce qui permet une excellente oxygénation des neurones. Ces deux facteurs sont très vraisemblablement déterminant pour assurer une bonne qualité des cultures de neurones et leur survie pendant trois semaines de culture in vitro. (3) Un autre avantage consécutif aux micro-volumes de ces chambres de cultures concerne les plus faibles quantités de milieux et de réactifs utilisées. Nous avons aussi utilisé, des dispositifs nommés « diodes 2C15 » contenant deux chambres de cultures connectées par des microcanaux asymétriques (entonnoirs). Les axones des neurones de la première chambre poussent de dans les microcanaux et établissent des connections synaptiques avec les neurones de la seconde chambre. Cette connectivité est donc unidirectionnelle et a été nommée diode neuronale

246

(Peyrin J.M. *et al.,* 2011). Ces diodes neuronales permettent de reconstituer *in vitro* des réseaux fonctionnels de neurones (Peyrin J.M. *et al.,* 2011). Le laboratoire a établi un modèle de reconstruction de réseaux cortex-hippocampe basé sur l'utilisation des diodes neuronales et qui permet d'étudier les effets d'oligomères du peptide amyloïde β sur le réseau et ses compartiments (synapse, axone, soma) (Deleglise et al 2014).

B. Inhibition pharmacologique de la Caspase-2 sur cultures de neurones hippocampiques.

Le rôle de la CASP-2 en tant que médiateur de la toxicité du peptide amyloïde a été mis en évidence dans plusieurs types neuronaux (neurones de l'hippocampe, neurones sympathiques, lignées PC12) de souris ou de rat par les groupes de M. Schelansky et C. Troy (Troy C.M. *et al.*, 2000 ; Troy et al., 2001 ; Ribe E.M. *et al.*, 2012 Jean Y.Y. *et al.*, en 2013 Pozueta et al., 2013). Dans le cadre de la thèse nous nous sommes proposés d'étudier l'influence de l'inhibition de la CASP-2 au niveau des synapse en traitant les neurones à des doses sub-toxiques d'oligomères $A\beta_{1-42}$ de manière à induire une perte synaptique tout en s'affranchissant de la mort du neurone.

1. Données préalablement obtenues au laboratoire

Pour cela, nous nous sommes basés sur des résultats précédemment obtenus au laboratoire par Cynthia Lefèbvre sur des neurones souris CASP-2^{flox/flox}. Dans cette lignée créée par E. Jacotot, les souris EJA-1 (fond génétique C57BL/6J) possèdent des séquences LoxP de part et d'autre de l'exon 6 du gène *CASP-2*. Cet exon contient la région qui code pour le site catalytique de la CASP-2 (**Figure 84A**).

Les analyses par Southern blot réalisées confirment l'homozygotie de la lignée (2 allèles CASP-2^{flox/flox}, **Figure 84A**). Lorsque des neurones de souris EJA-1 (CASP-2^{flox/flox}), sont traités avec une version chimère de la recombinase CRE (Penetratin-CRE), la recombinase reconnait les sites loxP et permet l'excision de l'exon 6. Cela entraîne donc la formation d'un codon stop prématuré, et l'extinction de la CASP-2 dans les neurones en cultures. Ainsi, sur des cultures de neurones primaires de l'hippocampe issus de souris WT et CASP-2^{flox/flox}, Cynthia a pu montrer dans les dispositifs microfluidique que (i) 100 nM d'oligomères d'A β_{1-42} induisaient une perte synaptique en quelques heures, sans effet cytotoxique, et que (ii) la délétion du gène *CASP-2* par ajout de Pen-CRE permettait de protéger les neurones de l'effet synaptotoxique des oligomères d'A β_{1-42} in vitro. Les résultats sont présentés en **Figure 84B**.

247

Les résultats sont également exemplifiés avec des clichés de microscopie à fluorescence ou l'on voit qu'en présence d'A β la densité synaptique décroit en comparaison à la situation contrôle sans peptide (**Co.**)



Figure 84. Les neurones délétés pour CASP-2 sont résistants à la perte synaptique induite par un traitement avec 100 nM d'oligomères d'A $\beta_{1:42}$.

(A) Représentation du gène *casp2* des souris WT et CASP-2^{flox/flox}. Les analyses par Southern Blot confirment que les animaux analysés sont bien homozygotes CASP-2^{flox/flox} en comparaison au souris WT (quatre exemples sont présentés). (B) Clichés d'immunofluorescence de neurones hippocampiques obtenus avec l'objectif 63x : Basson (vert), MAP2 (bleu), Phalloïdine (rouge) sur des neurones contrôles (Co.) et traités avec 100 nM d'oligomères $A\beta_{1-42}$ pendant 3h. En dessous, quantification de l'effet. Représentation en boîte à moustaches de la perte synaptique induite par les oligomères d'A β_{1-42} sur 100 µm de dendrites dans des cultures primaires de neurones issus de souris WT et CASP-2^{flox/flox}. En absence de CASP-2, la perte synaptique est nettement prévenue.

2. Effet synaptoprotecteur de la CASP-2 sur des neurones de l'Hippocampe.

Malheureusement, au cours de la thèse je n'ai pas pu retravailler sur les souris CASP-2^{flox/flox}. Toutefois, afin de compléter les données antérieures nous avons étudié l'effet d'une inhibition pharmacologique de la CASP-2 sur des cultures primaires de l'hippocampe issu d'embryon WT au stade E16 (**Figure 85A**). Le protocole est présenté en **Figure 85B**. Dans ce modèle nous avons montré qu'un traitement des neurones avec 10 nM d'A β_{1-42} oligomérique pendant 6h, induit une perte synaptique d'environ 50 %. Dans ces conditions, l'ajout de 30 μ M du premier composé **LJ2** permet de prévenir de manière significative de la perte synaptique induite par l'A β_{1-42} oligomérique (**Figure 85D**).



Figure 85. Le composé LJ2 à 30 μ M prévient de la perte synaptique induite par les oligomères A $\beta_{1.42}$ à 10 nM pendant 6h sur des cultures primaires de neurone de l'hippocampe.

(A) Embryon de souris SWISS au stade E16 à partir duquel sont isolés des neurones du cortex (Cx) et de l'hippocampe (Hi). (B) Procédure expérimentale pour l'analyse de la perte synaptique sur des dispositifs microfluidiques & dans lesquels les neurones de l'hippocampe sont cultivés à une densité de 15 M/mL pendant 18 jours. (C) Images d'immunofluorescence obtenues au 63X sur les cultures après traitement pharmacologique. Basson (vert), MAP2 (bleu), Phalloïdine (rouge) pour les conditions contrôle (Co.), traités avec 10 nM d'oligomères A $\beta_{1.42}$ pendant 6h. (D) Schéma représentatif de la zone active de la synapse (D'après Mittelstaedt T. *et al.*, 2010), Bassoon est un élément pré-synaptique et l'actine-F, reconnue par la Phalloïdine, est en majorité post-synaptique. (E) Quantification du nombre de synapse pour 100 µm de dendrites. Les expériences ont été réalisées 3 fois (Kruskall-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's ; *** p-value < 0.001).

Dans ce modèle nous avons également évalué l'effet des nouveaux composés **LJ2a** et **LJ3a**. Les résultats sont présentés sur les histogrammes en **Figures 86A et B**. Pour compléter les analyses précédentes nous avons ajouté un contrôle afin de s'assurer que l'effet synaptotoxique du peptide amyloïde était bien une conséquence de sa forme oligomérisée. Pour cela, nous avons utilisé une forme non oligomérisée du peptide, selon le protocole présenté en Matériels et Méthodes. Ainsi, nous avons pu montrer que contrairement aux oligomères le peptide A β_{1-42} sous une forme non oligomérisée à 10 nM pendant 6 h de traitement, n'induit pas de perte synaptique sur les cultures de neurones hippocampiques.

Nous avons enfin montré que les composés LJ2a et LJ3a ont un rôle synaptoprotecteur et ce, même à une concentration de 0,1 μ M. La puissance de ces composés *in vitro* se traduit donc par une efficacité sur ce modèle cellulaire. Cependant, un effet dose n'a pas pu être observé aux conditions testées. Des expériences complémentaires sont en cours afin de réaliser les analyses statistiques pour le composé LJ3a. D'autres expériences avec des doses plus faibles des deux composés ont aussi été initiées pour compléter l'étude.



Figure 86. Les composés Ll2a Ll3a ont un effet synaptoprotecteur à 1 µM, sur des cultures de neurones de l'hippocampe.

(A) Effet du composé LJ2a sur la perte synaptique induite par un traitement des neurones avec 10 nM d'oligomères A β_{1-42} . (B) Effet du composé LJ3a dans les mêmes conditions. Expériences réalisée 3 fois pour le composé LJ2a à 0,1 ; 1 et 10 μ M (et une seule fois pour le composé à 30 μ M. Les expériences ont été réalisées 2 fois pour le composé LJ3a à 0,1 ; 1 et 10 μ M (Kruskall-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's ; *** p-value < 0.001) et une fois pour la dose à 30 μ M, les analyses statistiques n'ont donc pas pu être appliquées pour cette molécules.

C. Effet synaptoprotecteur de LJ2 dans un modèle *in vitro* de la maladie d'Alzheimer

Afin de recréer un modèle de perte synaptique pouvant illustrer les événements ayant lieu à des étapes précoces de la maladie d'Alzheimer nous avons utilisés les dispositifs 2C15 qui nous permettent de récréer des réseaux de neurones fonctionnels *in vitro*. Le protocole expérimental suivi est illustré en **Figure 87A**. Dans ce modèle, les neurones du Cortex dans le compartiment proximal sont traités avec 10 nM d'oligomères A β_{1-42} . Dans ce modèle, nous avons pu mettre en évidence qu'un tel traitement dans la chambre proximale, induit une déconnexion synaptique au niveau des neurones de l'hippocampe dans la chambre distale (Deléglise et al., 2014) (**Figures 87B et C**). Dans ces conditions, nous avons montré qu'un cotraitement avec 30 µM du composé LJ2 sur les neurones de l'hippocampe permet de réduire

la perte synaptique de manière significative dans ce compartiment. À 10 μ M le composé n'a aucun effet et à 60 μ M il devient légèrement synaptotoxique (*Résultats non présentés*), ce qui explique l'effet observé à 60 μ M.

Par manque de temps, les expériences n'ont pas encore pu être réalisées avec les inhibiteurs de la nouvelle série LJ2a et LJ3a.





pendant 6h dans le compartiment hippocampique.

(A) Procédure expérimentale pour l'analyse de la perte synaptique sur des dispositifs microfluidiques 2c15 dans lesquels les neurones du Cortex sont ensemencés dans la chambre proximale et les neurones de l'hippocampe sont cultivés dans la chambre distale. (B) Images d'immunofluorescence obtenues au 63X sur les cultures suite au traitement pharmacologique. MAP2 (post-synaptique ; rouge), α -synucléine (pré-synaptique ; bleu) pour les conditions contrôle (Co.), traités avec 10 nM d'oligomères A β_{1-42} pendant 6h. et pour 30 μ M de LJ2 dans le compartiment hippocampique. (C) Quantification de la perte synaptique, avec en ordonnées le nombre de synapses pour 100 μ m de dendrites. Les expériences ont été réalisée 3 fois (Kruskall-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's ; *** p–value < 0.001).
II. Tau et Caspase-2

A. Reconnaissance de la séquence de clivage sur Tau par la Caspase-2

En plus de participer à la synaptotoxicité du peptide β-amyloïde, la CASP-2 a été proposée récemment comme pouvant participer à la physiopathologie impliquant la protéine Tau. En effet, Zhao X *et al.*, en 2016, ont rapporté que la CASP-2 était capable de cliver la protéine Tau au niveau de l'Asp-314 au sein d'une séquence YKPVD³¹⁴ (**Figure 88A**). Ce site de clivage n'avait pas été mis en évidence auparavant pour d'autres Caspases ou protéases et pourrait être uniquement la cible du clivage par la CASP-2. Dans un brevet publié le 19 Juin 2014 (Réf : US20140171373A1) la même équipe (Ashe K.H. et al.,) a mis en évidence qu'un peptide aldéhyde qui reprenait le site de clivage YPKVD-CHO était inhibiteur potentiel de la CASP-2. Sur cette base, nous avons souhaité valider le composé dans nos tests *in vitro*. De manière assez surprenante, les résultats ont révélé que non seulement le peptide aldéhyde Ac-YKPVD-CHO n'était pas reconnu par la CASP-2 et ce, même à une concentration de 100 μM et qu'en plus il était capable d'inhiber la CASP-3 avec une IC₅₀ de 60,4 ± 3,4 μM (**Figure 88B**). Par conséquent, nous ne sommes pas parvenus à reproduire les résultats publiés dans ce brevet, au laboratoire avec nos conditions expérimentales.



Figure 88. Évaluation de la reconnaissance de la séquence de clivage par la Caspase-2.

(A) Séquence de la protéine tau humaine entière de 441 acides aminés. Le site de clivage putatif de la CASP-2 est souligné en rouge. (B) IC₅₀ du composé Ac-YKPVD-CHO sur la CASP-3. L'activité de la 3 (0,1 nM) est lancée après 30 minutes d'incubation avec le peptide aldéhyde Ac-YKPVD-CHO à des concentrations croissantes (400 ; 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 0 μ M) par ajout du substrat Ac-DEVD-AMC (10 μ M). L'activité est suivie par libération de l'AMC au cours du temps, à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 1 mg/mL de BSA ; pH 7,4.

B. Clivage de Tau et Caspase-2

Dans leur étude, Zhao X et al, ont pu également mettre en évidence que le clivage de Tau au niveau de l'Asp-314, permettait la libération d'un fragment de 35 kDa. Bien que nous ne possédions pas l'anticorps nécessaire à la détection de ce fragment, nous avons choisi d'étudier le clivage par les CASP-2 et -3, d'une protéine Tau recombinante humaine entière de 441 aminés. Pour révéler les produits de clivage nous avons utilisés le Bleu de Coomassie ainsi que le colorant fluorescent Sypro[®] Ruby qui est une bonne alternative à la coloration résolutive à l'argent. Les résultats des clivages sont présentés en Figures 89A et B. Aucune des deux techniques de révélation n'a permis de mettre en évidence le fragment de clivage de 35 kDa puisque à une telle résolution, les profils de migration des CASP-2 et -3 seules (respectivement pistes 1 et 2) et des enzymes avec Tau (pistes 3 et 4) ne sont pas différents dans la zone de 25 à 50 kDa. Toutefois, il semblerait que la CASP-2 soit capable de cliver Tau, puisque dans la piste **3** de la **Figure 89A**, la coloration au bleu de Coomassie révèle une bande légèrement en dessous (flèche rouge N°1) de la zone de migration de la protéine Tau-441 recombinante (Contrôle de migration : piste 7, Figure 89A). De plus, lorsque l'enzyme a été préalablement incubée avec 100 µM de LJ2a, cette deuxième bande disparaît (piste 5, Figure 89A). Nous supposons également que dans nos conditions, la CASP-3 soit aussi capable de cliver Tau-441. En effet, lorsque Tau est mise en présence de l'enzyme, la bande correspondant à Tau-441 seule, est absente et fait place à un fragment de plus faible poids moléculaire. Toutefois, lors des deux tests réalisés avec le Bleu de Coomassie, contrairement à la CASP-2 (piste 5) nous ne sommes pas parvenus à obtenir le profil migratoire de la CASP-3 inhibée avec 100 μ M de LJ2a en présence de Tau (piste **6**).

La révélation des produits de clivage avec le colorant fluorescent ne nous a pas permis de conclure quant au clivage de la protéine Tau-441 par la CASP-2 (**Figure 89B**). Toutefois, dans cette expérience, nous semblons mettre en évidence, une nouvelle fois, un fragment de plus faible poids moléculaire lorsque Tau est incubée avec la CASP-3 (flèche rouge, Piste **4**, **Figure 89B**).

253



Figure 89. Profils de migration obtenus suite au clivage de la protéine recombinante Tau-441 entière par les CASP-2 et -3.

(A) Révélation des produits de clivage au Bleu de Coomassie (Expérience réalisée 2 fois). (B) Résultats du clivage révélé à l'aide du colorant fluorescent Sypro[®] Ruby (Expérience réalisée 1 fois). M : Marqueur de poids moléculaires (kDa) ; **1** : CASP-2 seule ; **2** : CASP-3 seule ; **3** : CASP-2 + Tau-441 ; **4** : CASP-3 + Tau-441 ; **5** : CASP-2 préalablement inhibée avec 100 μ M de LJ2a + Tau-441 ; **6** : CASP-3 préalablement inhibée avec 100 μ M de LJ2a + Tau-441 ; **7** : Tau-441 seule.

III. Caspase-2 et Inflammation

L'inflammation étant importante dans la maladie d'Alzheimer, nous nous sommes proposés de développer un modèle inflammatoire qui pourrait engager la CASP-2. Le but en développant un tel modèle est de s'affranchir de la mort cellulaire qui fait généralement intervenir d'autres Caspases. De plus, comme nous l'avons évoqué en introduction, des études *in vivo* et *in vitro* positionnent la CASP-2 comme possible modulateur de l'inflammation (Bronner D.N. et al, 2015). C'est pour cela que nous avons choisi de développer un modèle sur lignée afin d'évaluer les inhibiteurs, de la même façon qu'avec le test d'apoptose.

A. Mise en place du modèle

Pour ce modèle, nous avons utilisé la lignée humaine pré- monocytaire THP-1. Avant différenciation, les cellules sont en suspension avec un forme ovoïdes. Lorsque les cellules sont différenciées avec du PMA à 50 nM pendant 24h, les cellules post-mitotiques deviennent alors adhérentes. Les macrophages sont ensuite stimulés avec un traitement de 6h au LPS. Les cellules sont ensuite traitées avec de la nigéricine une toxine microbienne (Streptomyces

hygroscopicus), qui agit comme un ionophore de K⁺, et induit l'oligomérisation de l'inflammasome, l'activation de la CASP-1, l'inflammation, la libération extracellulaire de cytokines dont l'IL-1 β , et la pyroptose (O'Brien M. et al, 2017; He et al. 2016). Plus la concentration en Nigéricine est élevée plus les cellules ont une structure granuleuse qui rend compte d'une forte activité des cellules.

B. Optimisation des conditions de traitement

La nigéricine présente l'avantage de stimuler considérablement l'inflammation mais à partir d'une certaine dose sur un certain temps d'incubation, elle entraîne la mort des cellules. En **Figure 90A**, on constate que la Nigéricine à 5 μ M entraîne rapidement (1 à 2 heures) la mort comme en témoigne le marquage à l'iodure de Propidium. En **Figures 90B et C**, à 120 minutes d'incubation, la Nigéricine à 10 μ M et 20 μ M respectivement, entraîne également la mort cellulaire. En parallèle de l'évaluation de la mort cellulaire, nous avons évalué la libération d'IL-1 β dans le milieu. Les résultats de ces études sont présentés en **Figure 90D**. Dans ce modèle, la nigéricine induit une libération extra-cellulaire de cette cytokine de manière dose-dépendante avec un maximum pour un traitement de 5 μ M pendant 120 minutes. De plus, au temps d'exposition maximum, pour chaque dose de nigéricine, 25 μ M de VX-765, un peptidomimétique inhibiteur de référence de la CASP-1, ont été ajouté. Les résultats sont représentés par la condition en jaune dans l'histogramme de la **Figure 90D**. L'ajout de 25 μ M de VX-765 dans le milieu permet de diminuer considérablement le relargage d'IL-1 β . Au vu des résultats, il semble que la libération d'IL-1 β dans le milieu soit dépendante de la CASP-1, ce qui confirme une activation d'un inflammasome dans ce modèle.



Figure 90. Évaluation de la cytotoxicité et du relargage de cytokine IL-1 β pour des doses croissantes de nigéricine après 30, 60 et 120 minutes d'incubation.

(A) Effet de la nigéricine sur la mort cellulaire à 5 μ M, (B) 10 μ M et (C) 20 μ M pour différents temps d'incubation. (D) La nigéricine provoque la libération d'IL-1 β (pg/mL) dans le milieu après différenciation des cellules avec du PMA et une stimulation de 6h avec 1 μ g/mL de LPS. Dans ce modèle, au bout de 120 minutes de traitement aux trois concentrations en inducteur, le VX-765 (jaune) à 25 μ M permet de réduire à 90 % le relargage de la cytokine dans le milieu.

C. Évaluation des inhibiteurs LJ2 et Δ 2Me-TRP601

Nous avons pu obtenir des résultats préliminaires dans ces conditions, où nous avons réalisé une première évaluation de l'effet des composés LJ2 et $\Delta 2Me$ -TRP601 (renommé 604 pour la lisibilité des histogrammes). Leur effet, à 25 μ M, sur le relargage d'IL-1 β a été étudié. Les résultats obtenus sont regroupés sur les histogrammes en Figure 91, pour la nigéricine à 5 μ M pendant 60 et 120 minutes (A), à 10 μ M pendant 30, 60 et 120 minutes (B) ainsi qu'à 20 μ M pendant 30 et 120 minutes (C). Dans toutes ces conditions, les deux composés à 25 μ M permettent de réduire nettement le relargage d'IL-1 β dans le milieu. L'effet n'est pas aussi efficace que le VX-765 à la même concentration mais les résultats sont tout de même très encourageants. Toutefois, les profils d'IL-1 β obtenus avec les composés LJ2 et Δ 2Me-TRP601 sont les mêmes. Pour conclure quant à une véritable implication de la CASP-2 dans ce modèle inflammatoire, des expériences complémentaires devront être effectuées avec les composés LJ2 ou LJ3a à des doses plus faibles.



Figure 91. Les molécules LJ2 et Δ 2Me-TRP601 préviennent de la libération massive d'IL-1 β dans le milieu, induite par le traitement avec la Nigéricine.

(A) Nigéricine à 5 μ M pendant 60 et 120 minutes. (B) Nigéricine 10 μ M pendant 30, 60 et 120 minutes. (C) Nigéricine à 20 μ M pendant 30 et 120 minutes. Les expériences ont été réalisées 2 fois.

RESULTATS - PARTIE III -

AUTRES STRATEGIES D'IDENTIFICATION

I. Préambule

En parallèle de notre étude sur les inhibiteurs peptidiques du site actif nous avons également exploré deux autres stratégies. Une première visant à développer des peptides inhibiteurs de l'interface de dimérisation et une deuxième stratégie basée sur du criblage aléatoire et rationnel de petites molécules organiques. Ces deux stratégies visent toutes deux à enrichir le panel d'inhibiteurs de Caspases en proposant de nouveau *scaffolds* chimiques. Par rapport à ce dernier point, la conception d'inhibiteurs de l'interface est une vraie alternative puisque chez les Caspases, la composition de l'interface de dimérisation en termes d'acides aminés et de liaisons faibles établies est propre à chaque enzyme. Cette zone conditionne notamment le fait qu'une Caspase soit synthétisée sous forme de dimère ou de monomère inactif (Ma C. et al., 2014 ; Mackenzie S.H. Clark AC. 2013 ; Hardy J.A. et al., 2004 ; Pop C, et al., 2003).

II. Inhibiteurs de l'interface de dimérisation

Dans le cadre le programme Émergence de Sorbonne Universités, financé en 2017, en collaboration avec Dirk Stratmann de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC, Sorbonne université) nous nous sommes attachés à développer des inhibiteurs peptidiques de l'interface de dimérisation. Pour cela, une approche *in silico* a été employée pour identifier des peptides cycliques capables de se fixer à l'interface de dimérisation des CASP-2 et -3. La structures des interfaces de dimérisation des deux Caspases sont présentées en **Figure 92**. Avant de s'intéresser aux détails de la composition en acides aminés de cette interface, le premier fait marquant est la présence d'un pont disulfure entre les deux monomères de la CASP-2. Comme nous l'avons évoqué en introduction, ce pont n'est pas impliqué dans l'activation ni dans le maintien de la CASP-2 mais il aurait plutôt un rôle allostérique et son ciblage pourrait induire un effet à distance sur le site actif. Dans le cadre de la collaboration, la présence de ce pont a été au départ un frein pour le développement de cette catégorie d'inhibiteur sur la CASP-2, c'est donc pour cette raison que dans un premier temps, Dirk Stratmann et ses collègues, notamment Jaysen Sawmynaden (doctorant en Physico-chimie des Matériaux) se sont intéressés aux peptides ciblant la CASP-3.



Figure 92. Structure de l'interface de dimérisation des Caspase-2 et 3. La Caspase-2 présente un pont disulfure dynamique localisé dans une cavité de l'interface de dimérisation. Code PBD CASP-2 : 1PYO ; Code PBD CASP-3 : 2H65

A. Design de peptides ciblant l'interface de dimérisation de la Caspase 3

Sur la CASP-3, le but est de déstabiliser le dimère avec un peptide qui mime des zones de l'interface de dimérisation. Ainsi, ce peptide pourra entrer en compétition avec l'un des monomères pour déstabiliser le dimère. Mais cette stratégie repose sur une forte affinité du peptide pour le monomère. Pour cela, à l'aide du logiciel de visualisation et d'analyse UCSF Chimera 1.11.2, Jaysen a pu concevoir un premier peptide cyclique construit sur la base de l'association de deux fragments issus de l'interface de dimérisation de la CASP-3. Ces deux motifs ont pour séquence : CIVSML et DFLYAYS. Une D-proline suivie d'une L-proline ont été ajoutées sur chaque fragment afin de former deux coudes pour lier les extrémités N-ter et Cter (Figure 93A). Les modélisateurs ont choisi cette configuration d'acides aminés car c'est une approche classiquement utilisée pour créer des coudes stables pour relier des brins β (Ghosh D. et al., 2016). Le motif CIVSML interagissant directement avec la CASP-3, la séquence en acides aminés a été conservée. En revanche, pour le peptide FLYAYS qui ne semble pas interagir avec la CASP-3, des variations d'acides aminés ont été effectuées afin de stabiliser la conformation par contraintes stériques (acides aminés sous forme D) ou en favorisant la stabilisation du brin β par des liaisons hydrogènes (Fujiwara K. *et al.*, 2012). La nature des coudes a également été modifiée avec l'insertion de N-méthylés et d'acides aminés sous forme D pour générer des contraintes stériques stabilisatrices. Par exemple, pour faire place aux deux Prolines : Asparagine suivie d'une glycine ou une D-Alanine suivie d'une L-Alanine, toutes deux N-méthylés et enfin une D-Alanine suivie d'une L-leucine. L'ensemble des modifications résultent en la structure de plusieurs peptides qui sont référencés en Figure 94B.



Figure 93. Stratégie in silico utilisée pour la conception de peptide cydiques de l'interface de dimérisation. (A) Deux fragments, CIVSML et DFLYAYS, ont été extrait de l'interface de dimérisation de la CASP-3 et on servit de base pour la formation d'un peptide cyclique. (B)Tableau référençant les différents variants du fragment DFLYAYS. En minuscules sont représentés les acides aminés en forme D et le « ' » indique que l'azote du squelette peptidique est méthylé.

Pour les validations dans nos tests de cinétiques *in vitro* nous avions choisi le composé le plus stable selon les données *in silico*, il s'agissait alors du peptide cyclique N°6. Cependant, la synthèse du peptide N°6 qui admet deux N-méthylés successifs s'est avérée impossible. Seuls les deux fragments issus de l'interface de dimérisation de la CASP-3 ont donc été synthétisés. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes en **Figure 94**, où le pourcentage d'inhibition de l'activité Caspases est représenté en fonction des molécules à deux concentrations. En contrôle de l'inhibition, le Δ 2Me-TRP601 est utilisé à 10 µM.

En conclusion de ces premières expériences, dans nos conditions expérimentales aucun des deux fragments n'a inhibé l'activité CASP-3.



Figure 94. Les fragments CIVSML et DFLYAYS issus de l'interface de dimérisation de la CASP-3 n'inhibent pas la CASP-3 dans nos conditions expérimentales.

Les activités des CASP-2 (0,2 nM) et 3 (0,1 nM) sont mesurées pour l'hydrolyse d'Ac-VDVAD-AMC (25 μ M) et Ac-DEVD-AMC (10 μ M) en unité de fluorescence arbitraires (RFU) à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate ; pH 7,4 et 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ;1 mg/mL de BSA ; pH 7,4. Les lectures des activités sont lancées après 30 minutes d'incubation des peptides avec les CASP-2 et -3.

En alternative à ces peptides cycliques, Jaysen a identifié un peptide stable avec un motif $\beta \alpha \beta$ (**Figure 95B**) sans résidus modifiés. En analysant le monomère de la CASP-3, il a identifié une zone chargée positivement au niveau de l'interface de dimérisation (**Figure 95A**), ainsi il a modifié la séquence en acides aminés au niveau des brins β afin qu'ils correspondent à la séquence des peptides cycliques qu'ils avaient définis. Il a également ajouté quelques glutamine et acide glutamique au niveau de l'hélice α du peptide, dans le but d'améliorer l'affinité. Il a ensuite contrôlé à l'aide du logiciel de prédiction Pep-fold 3[®] que les changements d'acides aminés qu'il avait opérés n'impactent pas la stabilité du peptide. Il a enfin validé le peptide *in silico* en réalisant un *docking* du peptide sur le monomère de CASP-3, dans le but de visualiser la façon dont le peptide se positionne sur le monomère, à l'aide du logiciel HADOCK[®] (**Figure 95C**).

Nous avons donc étudié ce nouveau peptide *in vitro*, sur nos Caspases recombinantes. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme en **Figure 95D**. Dans nos conditions expérimentales, le peptide à 1, 10 et 100 μ M ne permet pas d'inhiber les activités Caspases, contrairement au composé contrôle Δ 2Me-TRP601 à 10 μ M.



Figure 95. La nouvelle stratégie basée sur un motif $\beta \alpha \beta$ stable ne permet pas d'inhiber la CASP-3 dans nos conditions expérimentales.

(A) Ciblage d'une zone chargée positivement (Rouge) au niveau de l'interface de dimérisation. Zones bleues : chargée négativement, gris : acides aminés hydrophobes. (B) Présentation de la structure du peptide, la séquence présentée en (D) correspond en code couleur des motifs, jaune : brin β ; rouge : hélice α et vert : boucles. (C) Docking *in silico* du peptide $\beta\alpha\beta$ sur le monomère de CASP-3, réalisé sur HADOCK[®]. (D) Effet du peptide à différentes concentrations sur les activités CASP-2 et -3. Dans nos conditions expérimentales, le composé ne révèle pas de profil d'inhibition intéressant.

B. Conception d'un pentapeptide cyclique ciblant l'interface de dimérisation de la Caspase-2

Pour la conception d'inhibiteur de l'interface de la CASP-2 la stratégie employée est différente. En effet, compte tenu de la présence du pont disulfure à l'interface de dimérisation, il n'est pas possible de conduire à une déstabilisation du dimère. Le but est ici est donc de concevoir une molécule capable de cibler le pont disulfure pour induire un effet à distance sur le site actif. Pour cela, les modélisateurs ont travaillé sur des peptides cycliques, le savoir-faire de l'équipe Dirk Stratmann. Sur la base d'un motif penta-glycine (GGGGG), ils ont fait varier 3 résidus (: GXGXGX, GXXGG, XXGGG, etc ...) afin de garantir une stabilité du peptide. Ils ont ensuite réalisé le docking in silico de chaque peptide sur la CASP-2 afin d'identifier le composé qui se fixe avec la meilleure affinité. En parallèle ils ont aussi analysé de manière fine, la structure cette interface de dimérisation singulière. Il s'avère que le pont disulfure est enfoui dans une cavité remplie de molécules d'eau qui forment un réseau relativement statique (Figure 96A). La conception est d'autant plus complexe que la molécule doit être capable de se loger dans cette cavité remplie d'eau pour atteindre le pont disulfure. Finalement c'est le motif GGWGQ qui a été sélectionné à l'issue des études de Docking. La structure de ce dernier ainsi que les interactions établies avec les acides aminés au niveau de la poche qui abrite le pont disulfure, est présentée en Figure 96B.

Malheureusement, la stratégie n'a de nouveau pas été « fructueuse » puisque le pentapeptide cyclique à 1, 10 et 100 μ M n'a aucun effet sur l'activité de la CASP-2.



Figure 96. Le peptide cyclique GGWGQ conçu in silico

(A) Représentation en surface de la structure de la CASP-2 avec un grossissement sur l'interface de dimérisation ou le pont disulfure est logé dans une poche remplie d'eau. (B) Structure du pentapeptide cyclique qui a donné les paramètres les plus favorables en termes de fixation sur CASP-2, par Docking *in silico*. (C) Effet du composé à 1, 10 et 100 μ M sur les activités CASP-2 et -3.

III. Stratégie petites molécules

Le groupe Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle dans lequel, j'ai réalisé ma thèse possède de nombreuses chimiothèques. Ainsi, afin d'élargir le panel d'inhibiteurs de Caspases nous nous sommes proposés de cribler quelques petites chimiothèques de petites molécules organiques de manière aléatoire. Dans ce contexte, 7 molécules Thioydantoïnes, 19 molécules dérivées de la Piperlongumine ainsi que 45 dérivés Furopyridine mono ou di-one, ont été testés sur les CASP-2 et -3. L'objectif était d'identifier de nouveaux scaffolds chimiques qui pourrait servir de base pour le développement d'inhibiteurs optimisés par chimie thérapeutique.

Nous nous sommes également intéressées à des petites molécules organiques qui avaient montré leur potentiel à inhiber les Caspases dans la littérature, tel est le cas pour les dérivés Triazoles et Quinazolines. Ainsi, des composés Triazoles (27 molécules) et Quinazolines (4 molécules) ont été sélectionnés à partir deux petites chimiothèques et ont été testés au cours de la thèse. Enfin, en 2017 Smith C.E. *et al.,* ont mis en évidence que 9 anti-inflammatoires non stéroïdiens, des molécules plutôt connues pour leurs potentiel à inhiber la Cyclooxygénease, étaient également d'inhiber la CASP-3, avec des IC₅₀ de l'ordre du micro et sub-micromolaire. Dans ce contexte nous nous sommes donc proposés de valider ces molécules dans nos conditions expérimentales.

Les *scaffolds* des molécules organiques testées au cours de la thèse sont présentés en **Figure 97**.



Figure 97. Scaffolds des petites molécules organiques testées au cours de la thèse avec une approche aléatoire ou plus rationnelle, basée sur des inhibiteurs déjà mis en évidence sur les Caspases.

A. Résultats du criblage obtenus sur les dérivés Triazoles et Quinazolines.

Les dérivés Triazoles et Quinazolines ont démontré leur potentiel à inhiber les Caspases. Nous nous sommes intéressés à deux chimiothèques du laboratoire afin de voir si nous pouvions élargir le panel d'inhibiteurs de ces catégories de molécules. Pour les Quinazolines, le laboratoire dispose d'une chimiothèque de plus de 100 composés, ainsi nous avons effectué une pré-sélection de molécule sur la base des données de la littérature. Nous avons donc sélectionné 4 molécules pour cette étude. Les molécules ont été testées sur les activités CASP-2 et -3 à 50 µM. Les résultats sont représentés dans les histogrammes en **Figures 98A-C**. En parallèle de ces tests, le Q-VD-OPh ou l'Ac-VDVAD-CHO sont utilisés en contrôle positif. Dans nos conditions expérimentales aucune molécule issue de ces deux petites séries n'ont montré de profil d'inhibition intéressant. En effet, aucun Triazoles (**Figures 98A et B**) ni aucune des quatre Quinazolines testées (**Figure 98C**) n'a montré une inhibition supérieure à 50 % à 50 µM.



Figure 98. Profil d'inhibition par les composés Triazoles et Quinazolines des CASP-2 et CASP-3 à 50 μ M. (A et B) Résultats du criblage sur les deux séries Triazoles du laboratoire. (C) Résultats du criblage sur les quatre Quinazolines. En contrôle de l'inhibition les composés Ac-VDVAD-CHO et Q-VD-OPh à 10 μ M. L'inhibition de la CASP-2 est représentée en rose/violet tandis que l'inhibition de l'activité CASP-3 est présentée en bleu sur les histogrammes. En ordonnée, le pourcentage d'inhibition des activités CASP-2 et - 3.

B. Résultats du criblage aléatoire

L'approche rationnelle n'ayant pas de donné de résultats concluants nous avons tenté d'explorer l'effet de nouveaux *scaffolds* chimiques sur les activités CASP-2 et -3. Ainsi, nous avons pu tester 3 petites librairies de molécules, disponibles au laboratoire. La Piperlongumine composé naturel pro-oxydant, qui a démontré sa capacité à inhiber l'activité Chymotrypsine-*like* de l'immunoprotéasome a été testée ainsi que quelques-uns de ses dérivés et une série de sept molécules Thioydantoines et 45 dérivés de furopyridines ont aussi été évalués. Les résultats de ces criblages sont présentés en **Figure 99A-C**. À 50 µM, ni la Piperlongumine (0) ni ses dérivés (**Figure 99A**) inhibent les activités CASP-2 et -3. Il en est de même pour les Tioydantoines (**Figure 99B**). Enfin, si l'on a cru un instant à une inhibition de l'activité CASP-2 par un composé furopyridines mono (di)-one à 10 µM, un complément d'analyse a mise en évidence qu'il s'agissant d'un artéfact car à deux reprise, l'effet n'a pas pu

être reproduit. Par conséquent, pour cette série de molécules également, aucun potentiel inhibiteur n'a pu être mis en évidence à $10 \mu M$.



Figure 99. Criblage aléatoire des activités CASP-2 ou -3.

(A) Résultat du criblage sur la Piperlongumine et ses dérivés à 50 μ M. **CTRL** : Ac-VDVAD-CHO à 10 μ M. (B) Résultat du criblage aléatoire réalisé sur la série Thioydantoines à 50 μ M (C) Résultats du criblage sur les 45 furopyridines mono (di)-one à 10 μ M. 1 : : Ac-VDVAD-CHO à 10 μ M. En contrôle de l'inhibition les composés Ac-VDVAD-CHO et Q-VD-OPh à 10 μ M. L'inhibition de la CASP-2 est représentée en rose/violet tandis que l'inhibition de l'activité CASP-3 est présentée en bleu sur les histogrammes. En ordonnée est représenté le pourcentage d'inhibition des activités CASP-2 et -3.

C. Criblage des Anti-inflammatoires non stéroïdiens

En 2017, Smith C.E. *et al.*, ont publiés que 9 anti-inflammatoires non stéroïdiens étaient de bons inhibiteurs de Caspases avec des IC_{50} de l'ordre du micro et sub-micromolaire. Les structures des composés ainsi que les valeurs des IC_{50} , en μ M, obtenues sont présentées en **Figure 100**. Après avoir testé les molécules sur l'activité des CASP-2 et -3 recombinantes, nous nous avons été incapables, dans nos conditions de cinétique enzymatique *in vitro*, de reproduire ces inhibitions. En effet, à 10 et 50 μ M aucun composé n'a d'effet sur l'activité CASP-3, pour cela les résultats n'ont pas été représentés. Dans leur étude, Smith C.E. *et al.*, utilisent un système couplé à la luminescence pour l'évaluation des inhibiteurs. En revanche, nous utilisons la fluorescence pour l'étude de nos activités enzymatiques. Il est possible que notre mode de détection ne soit pas adapté à l'étude de ces molécules.





D. Les coumarines, inhibent faiblement l'activité Caspase-2 in vitro

Le groupe Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle a démontré depuis quelques années que des dérivés coumariniques constituaient des inhibiteurs efficaces des kallicréines tissulaires (Pochet L. et al., 2000; Wouters J. et al., 2002). Ces dernières sont des protéases à Sérine dont la dérégulation de l'activité est très souvent associée à des pathologies telles que le syndrome de Netherton (Tan X. et al., 2015), le cancer ainsi que les maladies neurodégénératives (Prassas I. et al., 2015). Très récemment, le laboratoire a mis en évidence que certains de ces composés agissent en substrats suicides de la kallicréine 6, le mécanisme général d'action des coumarines carboxylates sur les protéases à Sérine est présenté en Figure 101A (Reboud-Ravaux M. et al., 2009). Une enzyme de cette famille ayant un rôle clé dans les maladies neurodégénératives. Compte tenu de la réactivité des composés et de leurs mécanismes d'action, nous avons testé quatre des meilleurs dérivés sur les CASP-2 et -3. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que trois d'entre eux à 100 µM, LP73, LP74 et JFR9 étaient capables d'inhiber l'activité CASP-2 in vitro. De cette étude nous avons pu extraire trois IC₅₀ qui sont référencées en Figure 101C. Les composés en question sont très faiblement reconnus par la CASP-2 avec des IC₅₀ qui varient entre 69,8 et 177 μM (Figures 101D-F). Toutefois, comme démontré sur l'histogramme en Figure 101B, ces composés, même à 100 µM ne sont que très faiblement reconnus par la CASP-3, notamment LP73 et JFR9. Malgré ce différentiel

dans l'effet, ces composés ne sont pas exploitables pour la suite de l'étude compte tenu du faible potentiel inhibiteur des différents composés sur la CASP-2.





(A) Mécanismes d'action des dérivés coumarines carboxylates sur les protéases à Sérines. L'attaque nucléophile de la lactone de la coumarine par la sérine catalytique conduit à la formation d'un acyle-enzyme. Si X est un bon groupe partant, un intermédiaire méthylène quinone peut se former. Ce dernier peut alors se lier de manière covalente avec le résidu nucléophile NuH du site actif menant à une inactivation définitive de l'enzyme (inactivation de type suicide, voie *a*. Si, le résidu n'est pas alkylé l'enzyme peut être régénérée par hydrolyse de l'acyle-enzyme (inactivation transitoire par formation d'un acyle-enzyme stable, voie *b* Reboud-Ravaux M. *et al.*, 2009 (B) Résultat du criblage des dérivés coumarines à 10 et 100 μ M sur les activités CASP-2 et CASP-3 (C) Tableau référençant les structures des composés inhibant la CASP-2 avec les valeurs d'IC₅₀ associées. (D-F) Profils d'inhibition de la CASP-2 par les trois dérivés coumariniques LP74, LP73 et JFR9 à pH 7,4, 37°C. [CASP-2]₀ : 0.2 nM, [Ac-VDVAD-AMC]₀ : 25 μ M à 37°C dans 20 mM HEPES ; 5 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,1 % CHAPS ; 800 mM Succinate

RESULTATS - PARTIE IV -

TRAVAUX ANNEXES

Au cours de ces trois années de thèse j'ai pu acquérir des compétences transversales dans les domaines de l'enzymologie et de la Biologie cellulaire. En parallèle de mon sujet de thèse, ces compétences m'ont également permis de participer à des travaux annexes qui ont fait l'objet de 2 publications en premier et second auteur. Le groupe Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle, a, depuis de nombreuses années, une expertise dans le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de protéases majeures. Dans les parties présentées *ci-après* sont synthétisées les études auxquelles j'ai été associée.

I. Modulation de l'activité de la kallicréine 6, la protéase à sérine la plus abondante du système nerveux central

L'intérêt du laboratoire se porte notamment sur les kallicréines, des protéases à Sérine dont l'altération de l'activité est impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment dans les maladies neurodégénératives (Prassas I. *et al.*, 2015). Ils ont pu identifier, à partir de criblage virtuel et de conception rationnelle, plusieurs inhibiteurs organiques. Ces derniers ciblent les kallicréines tissulaires humaines, KLK5, 7, 8 et 14 qui sont impliquées dans les pathologies de la peau et l'invasion tumorale (Tan X. *et al.*, 2015). Plus récemment, leur objectif s'est tourné vers le développement d'inhibiteurs de la kallicréine 6, une cible thérapeutique émergente des pathologies neurodégénératives telles que, la maladie d'Alzheimer (Diamandis E.P. *et al.*, 2000 ; Patra K. *et al.*, 2018) de Parkinson (Tatebe H. *et al.*, 2010 ; Spencer B. *et al.*, 2015) et la sclérose en plaques (Scarisbrick I.A. *et al.*, 2008 ; Yoon H. *et al.*, 2016). Le potentiel des composés poly-hétérocycles, triazoles et coumarines carboxylates, à inhiber la kallicréine 6 a été préalablement mis en évidence au laboratoire et j'ai eu la chance de participer à leur caractérisation. Ce travail a fait l'objet d'une publication que j'ai cosigné en second auteur en 2018 dans la revue Biological Chemistry.

Short Communication

Feryel Soualmia, Elodie Bosc, Sabrina Aït Amiri, Dirk Stratmann, Viktor Magdolen, Dalila Darmoul, Michèle Reboud-Ravaux and Chahrazade El Amri*

Insights into the activity control of the kallikreinrelated peptidase 6: small-molecule modulators and allosterism

https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0336 Received December 28, 2017; accepted March 26, 2018; previously published online April 11, 2018

Abstract: The activity of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) is deregulated in various diseases such as cancer and neurodegenerative diseases. KLK6 is thus considered as an attractive therapeutical target. In this short report, we depict some novel findings on the regulation of the KLK6 activity. Namely, we identified mechanism-based inhibitors (suicide substrates) from an in-house library of 6-substituted coumarin-3-carboxylate derivatives. In addition, a molecular dynamics study evidenced the allosteric behavior of KLK6 similar to that previously observed for some trypsin-like serine proteases. This allosteric behavior together with the coumarinic scaffold bring new opportunities for the design of KLK6 potent activity modulators, useful as therapeutics or activity-based probes.

Keywords: kallikrein-related peptidase 6; serine protease allostery; small-organic modulators; suicide substrate.

Feryel Soualmia, Elodie Bosc, Sabrina Aït Amiri and

The discovery of the kallikrein-related peptidase KLK6 was made almost concomitantly by different research groups in the mid-1990s. KLK6 belongs to the family of kallikrein-related peptidase family that consists of 15 (KLK1-15) secreted serine proteases and was isolated for the first time by Anisowics and colleagues as 'Protease M' whose gene was overexpressed in breast and ovarian tumor tissues (Anisowicz et al., 1996). Furthermore, KLK6 was independently cloned by three laboratories as an important marker in neurodegenerative diseases. Yamashiro and coworkers have detected a very strong expression of its gene in the brain and named it 'neurosin' (Yamamura et al., 1997). Similar results have been reported by Little et al. who named this gene 'zyme' and highlighted its possible involvement in Alzheimer's disease (Little et al., 1997). Finally, the human gene and also its murine orthologue were cloned by Scarisbrick and colleagues who named it 'Myelencephalon-specific protease (MSP)' (Bernett et al., 2002). The sequencing of the human genome and particularly of the kallikrein locus, showed that 'Protease M', 'Zyme', 'Neurosin' and 'MSP' correspond to the same enzyme, kallikreinrelated peptidase 6 (KLK6, also hK6 in humans). KLK6 is widely expressed and is particularly abundant in the central nervous system (CNS) with a major distribution in the brainstem and spinal cord but also in hippocampus, frontal lobe, black substance, subthalamic nucleus and thalamus (Wang et al., 2008; Bayani and Diamandis, 2011; Scarisbrick and Blaber, 2013; Prassas et al., 2015). In the brain, KLK6 has been particularly studied for its involvement in neurodegenerative diseases and in certain tumors (Wang et al., 2008; Bayani and Diamandis, 2011; Scarisbrick and Blaber, 2013; Prassas et al., 2015). The first inhibitors of KLK6 have been identified in 2012 (Liang et al., 2012), using virtual screening and two series of derivatives were brought out, with either an amidinothiophene group or a para-amidobenzylamine group at the position P₁. More recently, a peptide inhibitor of KLK6 derived from its natural substrate, PAR-2

^{*}Corresponding author: Chahrazade El Amri, Sorbonne University, Faculty of Sciences and Engineering, IBPS, UMR 8256 CNRS-UPMC, ERL INSERM U1164, Biological Adaptation and Ageing, F-75252 Paris, France, e-mail: chahrazade.el_amri@upmc.fr

Michèle Reboud-Ravaux: Sorbonne University, Faculty of Sciences and Engineering, IBPS, UMR 8256 CNRS-UPMC, ERL INSERM U1164, Biological Adaptation and Ageing, F-75252 Paris, France Dirk Stratmann: Sorbonne University, Faculty of Sciences and Engineering, IMPMC, UMR 7590 CNRS-UPMC-MNHN-IRD, F-75252 Paris, France

Viktor Magdolen: Clinical Research Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Technical University Munich, D-81675 Munich, Germany

Dalila Darmoul: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Hôpital Saint Louis, F-75010 Paris, France; and Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMRS- S976, F-75010 Paris, France



Figure 1: Structures of compounds **1** and **2** and their potential mechanism of inhibition of KLK6. NuH, Nucleophile. Pathway a: transient inactivation by formation of a stable acyl-enzyme. Pathway b: suicide-type inactivation by the inhibitor acting as a suicide substrate.

(proteinase activated receptor-2) was identified (Severino et al., 2015). However, no mechanisms were reported for these two categories of presumably reversible inhibitors. Thus, there is an important need to develop KLK6 inhibitors acting through mechanisms different from that previously described, like suicide substrates that may allow to fine tune selectivity.

Moreover, according to a newly emerging paradigm, the activity and specificity of serine proteases (especially for the trypsin-like family) suggest that the activity may be controlled by the equilibrium between an inactive mature (E*) form and active mature (E) form (Di Cera, 2009a,b; Pozzi et al., 2012, 2013).

In this report, we contribute to the enlargement of the repertoire of KLK6 inhibitors by screening our previously reported coumarin library (Tan et al., 2015) and to the identification of mechanism-based inhibitors of KLK6. Moreover, we provided a molecular dynamics analysis of the KLK6 'apo-form' that revealed an allosteric behavior with the identification of two enzymatic forms that rely on inactive and active mature conformations.

Coumarin derivatives display diverse pharmacological activities supporting their potential therapeutic use (as antitumor, anti-infective, anti-inflammatory and antioxidant agents) (Srikrishna et al., 2016). 6-Substituted coumarin-3-carboxylate derivatives were identified in our laboratory as inhibitors of the kallikrein-related peptidases KLK5, KLK7 and KLK14 involved in epidermis homeostasis and several skin diseases (Tan et al., 2015). 6-Substituted coumarin-3-carboxylate derivatives constitute remarkable non-peptidic protease inhibitors characterized by easy access to organic synthesis, high inhibitory potency and extreme sensitivity to structural variations at the 3- and 6-positions that influence not only the specificity but also the inhibition mechanism of the targeted enzyme (Doucet et al., 1999). Inhibition of KLK5, KLK14 and matriptase by certain compounds was found to be mainly reversible, whereas KLK7 was always irreversibly inhibited through a suicide-type mechanism as shown in Figure 1. Several compounds acted selectively on KLK7, with IC_{50} values in the low micromolar and nanomolar ranges (Tan et al., 2015). By screening our whole library of 260 coumarinic compounds against KLK6, we identified two efficient inhibitors 1 and 2 (Figure 1) characterized by IC_{50} values of 3.1 ± 0.2 µM and 0.9 ± 0.1 µM, respectively, after 15 min of treatment. To determine their mechanism of action, the dilution method was used. We showed that the activity of KLK6 previously inhibited at 80% was not recovered after a dilution by a factor of 100. Furthermore, to distinguish between a transient acyl-enzyme and an irreversible inhibition (Figure 1), we used the powerful nucleophile hydroxylamine at 0.5 M and pH 8.0 before determination of the remaining activity. After this hydroxylamine treatment, no reactivation was observed excluding a transient inhibition due the formation of a stable acyl-enzyme. Compounds 1 and 2 acted thus as irreversible suicide inhibitors following the minimum kinetic scheme:

$$E + I \xrightarrow{K_I} EI \xrightarrow{k_i} E - I$$

where E and I are the free protease and the free inhibitor, EI is the kinetic chimera of the Michaelis complex and the acyl-enzyme and E–I is the inactivated enzyme. The kinetic constant ratios k_i/K_i (efficacy indexes) were determined using the continuous method as described in Tan et al. (2015) (Figure 2A and B). We found that compound



Figure 2: Inactivation of KLK6 by compounds **1** and **2** characterized by the continuous kinetic method at pH 7 and 37°C. (A) Fluorescent product formed over time in the presence of different concentrations of compounds **1** and **2** (Active KLK6 was purchased from Abcam[®], UK buffer: 50 mm Tris, 1 m citrate, 0.05% Brij-35; 100 μ m Boc-QAR-AMC, Bachem, Switzerland). (B) Secondary graphs for the determination of k_i/K_i . The expressions of π and [I]' are given in equation 1. Non-linear regression fits of the experimental data to equation 1 were performed using Kaleidagraph software. (C) Comparison between the pH profiles of substrate (Boc-QAR-AMC) hydrolysis into product (left) and inactivation of KLK6 by the suicide substrates **1** and **2** (right).

2 was a better inactivator of KLK6 than compound **1** with a k_i/K_i inactivation index of $131 \pm 13 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ instead of $19 \pm 2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for compound **2** (pH 7). It was also two-fold more efficient on KLK6 than on the KLK5, another trypsin-like kallikrein-related peptidase (Tan et al., 2015). To conclude, compound **2** constitutes a novel example of inhibitor acting irreversibly on KLK6 susceptible to be

optimized in order to develop tools as KLK6 activity-based probes. We also evaluated the influence of pH between 7 and 9 on inhibitory potency of compounds **1** and **2** (Figure 2C). The inactivation profile with pH followed the same progression than the enzymatic activity (k_{cat}/K_m) . The optimum k_i/K_i index was found at pH 8 with 31 M⁻¹ · s⁻¹ for compound **1** and 203 M⁻¹ · s⁻¹ for compound **2**.



В





Figure 3: Structural insights into KLK6 activity modulation.

(A) Proposed structural basis for the inactivation of KLK6 by compound 2. (a) The *in silico* docking of compound 2 within the active site of KLK6 was performed using Molegro Virtual Docker. KLK6 is represented by pink surface and 2 by yellow sticks. The subsites S1, S2 and the catalytic triad are indicated. (b) Binding mode of 2 (yellow sticks) to active site residues (pink sticks). The distances (Ångstroms) in the binding mode between the lactone of coumarin ring the hydroxyl of the active serine 195 as well as the imidazole of the histidine 57 and the CH₂Cl group at X are indicated. (B) MD simulation of mature apo-KLK6, 60 ns using GROMACS 4.6.5. (a) Illustration of activity plasticity over the time, the broken-line circle materializes the active site, the catalytic serine Ser195 is shown in red. (b) Evolution of the global conformation of the apo-KLK6 in cartoon representation (blue, start of simulation; green, end of simulation). The strand and the loop of the S1 site are in orange, the loop 214–220 in red. (c) The 'open' active site of KLK6 (white arrow, left pose) is 'closed' at the end of the simulation (right pose). The KLK6 is shown in surface representation (gray). The residues of the S1 site are in orange, the residues 214–220 in red. S1 residues: 189–195, 214–220, 224–228. The volumes of the active site at the beginning and the end of the simulation are 92 Å³ and 43 Å³, respectively (Molegro Virtual Docker).

Product =
$$\int_{0}^{t} v_{i} \cdot dt$$
; $v_{i} = v_{0} * e^{-\pi * t}$; $\pi = \frac{k_{i} * [I]'}{K_{I} + [I]'}$
where $[I]' = \frac{[I]}{1 + \frac{[S]}{K_{m}}}$ (1)

The proposed mechanism-based inhibition was supported by molecular modeling performed using the software Molegro Virtual Docker (Thomsen and Christensen, 2006) (Figure 3A). The analysis of the best pose for compound **2** bound to KLK6 active site revealed that the bi-substituted phenyl (2-Cl, 5-Cl) group was accommodated into the S1 subsite. The distance between the hydroxyl oxygen of Ser195 and the carbonyl carbon of the coumarin lactone was compatible with a nucleophilic attack by the catalytic serine that can lead to an acyl-enzyme formation. The acyl-enzyme can follow two distinct pathways: (i) hydrolysis by a water molecule, allowing the regeneration of the catalytic site of KLK6; (ii) formation of an additional covalent bond involving a nucleophile (His57) after demasking of latent methylene quinone through elimination of the good leaving group Br^- (compound **1**) or Cl⁻ (compound **2**) (Figure 1). The distance (2.1 Å) observed between the CH₂Cl carbon and the imidazole group of His57 was compatible with such a reaction that can lead to the experimentally observed irreversible inhibition (Figure 3A).

In parallel to modeling studies, we performed molecular dynamics simulations (MD) that are very useful to predict and evaluate protein structural plasticity and stability, and understand enzymatic mechanisms particularly in the case of proteases. Only a few MD studies have been reported for kallikrein-related peptidases and they concerned KLK3, KLK5 and KLK7 complexed with inhibitors (Oliveira et al., 2014) or KLK4, KLK5 and KLK14 complexed to high efficient designed substrates (de Veer et al., 2012). We performed MD simulations of 60 ns in explicit solvent at 310 and 350 K using a KLK6benzamidine complex (PDB code: 1L06) (Bernett et al., 2002) using GROMACS 4.6.5 (http://www.gromacs.org/ About Gromacs/) and AMBER99SB force field with a time step of 2 fs. Conformational behaviors of both complexed and apo-KLK6 (e.g. without ligand) have been analyzed applying GROMAC 5.1.2, VMD and PyMol softwares. No large amplitude movements within structural domains were noticed. However, in the absence of ligand, the active site volume surprisingly decreased significantly, from 92 Å³ to 43 Å³ within 20 ns (Figure 3B; see also the RMSD plots in the online Supplementary Material, Figures S1 and S2). When analyzing the structural details in particular at the vicinity of the active site, a reorientation of the 214-220 loop was observed and resulted in the obstruction of active site cavity by the 215-217 segment residues. In conclusion, the mature apo-form of KLK6 in the absence of ligand seems to be characterized by a closed inactive conformation (E* form), that prevents interaction with a ligand. Such a closed mature conformation implicating 215-217 segment was already reported for some serine proteases like thrombin but rarely for kallikrein-related peptidases. However, updated modalities of activity regulation within KLK family has been recently reported, through an exhaustive structural and kinetics study of KLK2 (Skala et al., 2014). A comparative structural analysis of 99-loop was performed and allowed to provide a rational classification. The 99-loop was identified as a key structural element to modulate KLK2 activity

particularly involved in zinc (Zn²⁺) binding. An interplay between the 99-, 148-, and 220-loops was reported. These regulating loops were suggested to fine-tune the equilibrium between open E and closed E*conformations of KLK2 through concerted conformational changes, allowing or preventing substrate access to the active site. These findings early allowed to extent the concept of conformational selection in trypsin-related proteases (E vs. E*). In contrast to KLK6, 99-loop is short without insertions suggesting distinct activity regulation (Gomis-Ruth et al., 2002; Skala et al., 2014). Our preliminary results suggest a novel hypothesis to better understand the activity regulation of KLK6 in accordance with the emerging concept of allostery of serine proteases. Ongoing biochemical studies in our lab particularly those using various chemical tools may allow to rationalize these in silico observations. In recent years, kinetic studies on thrombin (Lechtenberg et al., 2012), the key serine protease in the coagulation cascade, has demonstrated an unexpected plasticity of trypsin-like folding like thrombin. Fast kinetics experiments show that the E*-E conversion takes place on a time scale of less than 10 ms, while the zymogen-protease conversion evolves on a larger time scale (100-1000 ms) (Di Cera, 2009a,b). Hence, an analogous regulation of a reversible allosteric E*/E equilibrium in addition to zymogen to mature protease conversion could constitute innovative therapeutical strategies aiming to fine-tune active and inactive states of mature KLK6.

Taken together, we report the first KLK6 low-molecular-weight suicide substrates obtained from our coumarin library and provide data suggesting an allosteric behavior of KLK6 as previously reported for some other trypsin-like serine proteases like thrombin. We found that inhibitors **1** and **2** were devoid of cytotoxicity toward mouse cortical primary neurons up to 100 μ M (data not shown). Finally, the 6-substituted coumarin-3-carboxylate structure represents a valuable scaffold that could serve for a platform for the design of activity-based probes to dissect out the KLK6 enzymatic activity in biological samples and pathophysiological processes such as CNS diseases.

Acknowledgments: The authors are grateful to Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Institut National pour la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for research funding and to the French Ministry of Research and Education for PhD fellowships to F.S., E.B. and S.A.A. We also thank the Centre de Coopération Universitaire Franco-Bavarois for travel grants (F.S., V.M., C.E.).

References

- Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., Mok, S.C., and Sager, R. (1996). A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. Mol. Med. 2, 624–636.
- Bayani, J. and Diamandis, E.P. (2011). The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6). Clin. Chem. Lab. Med. *50*, 211–233.
- Bernett, M.J., Blaber, S.I., Scarisbrick, I.A., Dhanarajan, P., Thompson, S.M., and Blaber, M. (2002). Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. J. Biol. Chem. 277, 24562–24570.
- de Veer, S.J., Swedberg, J.E., Parker, E.A., and Harris, J.M. (2012). Non-combinatorial library screening reveals subsite cooperativity and identifies new high-efficiency substrates for kallikreinrelated peptidase 14. Biol. Chem. 393, 331–341.
- Di Cera, E. (2009a). Kinetics of allosteric activation. Methods Enzymol. 466, 259–271.

Di Cera, E. (2009b). Serine proteases. IUBMB Life. 61, 510-515.

- Doucet, C., Pochet, L., Thierry, N., Pirotte, B., Delarge, J., and Reboud-Ravaux, M. (1999). 6-Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. J. Med. Chem. 42, 4161–4171.
- Gomis-Ruth, F.X., Bayes, A., Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., Tsetsenis, T., Villegas, V., Aviles, F.X., and Coll, M. (2002). The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. J. Biol. Chem. 277, 27273–27281.
- Lechtenberg, B.C., Freund, S.M., and Huntington, J.A. (2012). An ensemble view of thrombin allostery. Biol. Chem. *393*, 889–898.
- Liang, G., Chen, X., Aldous, S., Pu, S.F., Mehdi, S., Powers, E., Giovanni, A., Kongsamut, S., Xia, T., Zhang, Y., et al. (2012). Virtual screening and X-ray crystallography for human kallikrein 6 inhibitors with an amidinothiophene P1 group. ACS Med. Chem. Lett. *3*, 159–164.
- Little, S.P., Dixon, E.P., Norris, F., Buckley, W., Becker, G.W., Johnson, M., Dobbins, J.R., Wyrick, T., Miller, J.R., MacKellar, W., et al. (1997). Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. J. Biol. Chem. 272, 25135–25142.
- Oliveira, J.P., Freitas, R.F., Melo, L.S., Barros, T.G., Santos, J.A., Juliano, M.A., Pinheiro, S., Blaber, M., Juliano, L., Muri, E.M., et al. (2014). Isomannide-based peptidomimetics as inhibitors for human tissue kallikreins 5 and 7. ACS Med. Chem. Lett. *5*, 128–132.

- Pozzi, N., Vogt, A.D., Gohara, D.W., and Di Cera, E. (2012). Conformational selection in trypsin-like proteases. Curr. Opin. Struct. Biol. 22, 421–431.
- Pozzi, N., Chen, Z., Gohara, D.W., Niu, W., Heyduk, T., and Di Cera, E. (2013). Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. J. Biol. Chem. 288, 22734–22744.
- Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. Nat. Rev. Drug Discov. *14*, 183–202.
- Scarisbrick, I. and Blaber, M. (2013). Kallikrein-related peptidase 6. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, A. Barrett, N. Rawlings, and J. Woessner, eds. (Cambridge, MA, USA: Academic Press, Elsevier), pp. 2778–2788.
- Severino, B., Fiorino, F., Corvino, A., Caliendo, G., Santagada, V., Assis, D.M., Oliveira, J.R., Juliano, L., Manganelli, S., Benfenati, E., et al. (2015). Synthesis, biological evaluation, and docking studies of PAR2-AP-derived pseudopeptides as inhibitors of kallikrein 5 and 6. Biol. Chem. *396*, 45–52.
- Skala, W., Utzschneider, D.T., Magdolen, V., Debela, M., Guo, S., Craik, C.S., Brandstetter, H., and Goettig, P. (2014). Structurefunction analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity. J. Biol. Chem. 289, 34267–34283.
- Srikrishna, D., Godugu, C., and Dubey, P.K. (2018). A review on pharmacological properties of coumarins. Mini Rev. Med. Chem. *18*, 113–141.
- Tan, X., Soualmia, F., Furio, L., Renard, J.F., Kempen, I., Qin, L.,
 Pagano, M., Pirotte, B., El Amri, C., Hovnanian, A., et al.
 (2015). Toward the first class of suicide inhibitors of kallikreins involved in skin diseases. J. Med. Chem. 58, 598–612.
- Thomsen, R. and Christensen, M.H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. J. Med. Chem. 49, 3315–3321.
- Wang, Y., Luo, W., and Reiser, G. (2008). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. Cell Mol. Life Sci. *65*, 237–252.
- Yamamura, Y., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Nakazato, H., Tsujimura, A., and Yamaguchi, N. (1997). Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239, 386–392.

Supplementary Material: The online version of this article offers supplementary material (https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0336).

II. Identification de l'immunoprotéasome comme cible du composé pro-oxydant bien connu, la Piperlongumine

Un autre intérêt du groupe se porte sur le développement d'inhibiteurs covalents ou non covalents du protéasome 26S. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai pu participer à l'étude du mécanisme d'inhibition de la piperlongumine et de ses dérivés sur l'immunoprotéasome. Les matériels et méthodes ainsi que les résultats obtenus au cours de cette étude ont été publiés en co-premier auteur dans le *journal Biochemical and Biophysical Research Communications* (BBRC), en 2018.

Dans les cellules eucaryotes, le système ubiquitine-protéasome (UPS) joue un rôle essentiel dans la dégradation des protéines intracellulaires. Ce système, qui implique le protéasome constitutif, est finement régulé et a un rôle crucial dans une variété de processus cellulaires majeurs, tels que : le renouvellement protéique, le cycle cellulaire, la signalisation cellulaire mais aussi l'apoptose, la réponse immunitaire et l'inflammation (Ciechanover A. *et al.,* 2003). Après une exposition de la plupart des cellules à l'interféron- γ ou au TNF, une forme dite « inductible » du protéasome est exprimée, on parle dans ce cas de l'immunoprotéasome (Nathan J.A. *et al.,* 2013).

En termes de structure, le protéasome constitutif 265 (**Figure 102A**) est un complexe de 2,5 mega Dalton qui possède un cœur catalytique en tonneau, appelé *core particle* 20S (CP), composé de 28 sous-unités où viennent se positionner par-dessus et par-dessous des domaines régulateurs 19S qui lient les substrats ubiquitinylés (**Figure 102B**). Ces domaines possèdent six sous-unités ATPase qui catalysent le dépliement des protéines et l'ouverture du cœur 20S pour l'accès au niveau du cœur central. Les 28 sous-unités (α et β) du CP forment un empilement de quatre structures heptamériques circulaires (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7) (**Figure 102C**). Les deux anneaux externes formés par l'assemblage des sous-unités α ont plutôt un rôle régulateur et structural tandis que les deux anneaux internes, issus de l'association des sous-unités (cCP). En effet, les unités catalytiques β 1, β 2 et β 5 portent respectivement les activités : *Caspase-like* (clivage après des résidus acides), *trypsin-like* (cliva après des résidus basique) et *chymotrypsin-like* (clivage après des résidus hydrophobes) (Richy N. *et al.*, 2018 ; Cromm P.M. *et al.*, 2018). Dans l'immunoprotéasome (iPr), les trois sous-unités catalytiques du protéasome constitutif font place à trois sous-unités homologues dites

272

β1i/LMP2, β2i/LMP10 et β5i/LMP7 (**Figure 102B**) dont l'expression est stimulée avec l'IFN-γ notamment.



Figure 102. Structure du protéasome 26S.

(A) Le protéasome est l'association d'un cœur central, 20S, qui abrite les activités catalytiques « *Core particle* » et de deux unités régulatrices 19S qui se positionnent au-dessus et en dessous du cœur. (B) Les sous-unités 19S sont divisées en une base formée de 10 sous-unités et d'un couvercle de 9 sous-unités qui abrite l'activité déubiquitinase Rpn11. Le cœur 20S est formés de 28 sous-unités agencées en 4 anneaux empilés selon un modèle $\alpha\beta\beta\alpha$. (C) Les sous-unités α et β sont organisés en anneaux de 7 sous-unités chacun. Les sous-unités β abritent les activités catalytiques : 1 (CL), β 2 (TL), and β 5 (ChTL). D'après Cromm P.M. *et al.*, 2018).

Compte tenu du nombre de substrats ciblés et le nombres de processus qui impliquent l'UPS, il n'est pas étonnant qu'une dérégulation de cette voie de dégradation se retrouve au cœur de nombreuses pathologies. D'ailleurs le protéasome est une cible avérée dans le traitement des cancers hématologiques, avec trois médicaments sur le marché : Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (Kyprolis®) et l'Ixazomib (Administration orale, Ninlaro®). Ces inhibiteurs covalents inhibent essentiellement l'activité ChT-L portée par la sous-unité β 5 du cCP avec toutefois des effets croisés sur l'activité de l'iCP. Ces derniers expliquent en partie les effets secondaires observés au cours des traitements contre le cancer. Compte tenu des défauts de pharmacocinétique que peuvent présenter ces inhibiteurs (stabilité, sélectivité, réactivité et perméabilité), des inhibiteurs non-covalents sont aussi décrits. D'ailleurs les peptides noncovalents tels que le peptide naturel TMC-95A et ses mimes cycliques et linéaires ont été conçus pour inhiber efficacement les activités ChT-L et T-L du protéasome 20S et ne présentent pas d'effet croisés sur les protéases concurrentes telles que les Cathepsines et la Calpaïne (Devergne A. *et al.,* 2013). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, le maintien de l'intégrité de la cellule par l'UPS qui prévient normalement de la présence de

protéines mal repliées, susceptibles de s'agréger, est altéré. Dans ce contexte, l'agrégation de protéines telles que : l' α -synucléine (Parkinson), le peptide β -amyloïde (Alzheimer), et les protéines polyglutaminées (Huntington) saturent l'UPS et compromettent son fonctionnement et empêchent également la dégradation des autres substrats protéiques (Cecarini V. *et al.,* 2016 ; Boland B. *et al.,* 2018).

Dans l'étude que nous avons réalisé sur le protéasome, l'intérêt s'est porté sur la piperlongumine et deux de ses dérivés. Cette dernière est un alcaloïde, isolé de plantes de la famille des *Piperaceae*, connu pour induire la mort par apoptose de cellules cancéreuses du poumon, du sein, et de la vessie mais sans effet sur les cellules saines. La piperlongumine serait aussi un très bon agent sénolytique c'est-à-dire qu'elle a une action cytotoxique préférentielle envers des cellules (Wang Y. *et al.*, 2016).

Dans notre étude, nous avons démontré que la piperlongumine et deux de ces analogues, inhibent sélectivement l'activité ChT-L de l'iPr avec des effets négligeables sur le CPr. Nous avons alors pu déterminer les valeurs des IC₅₀ de chacun des composés, ainsi la Piperlongumine inhibe l'activité ChT-L avec une IC₅₀ de 15,0 ± 1,1 μ M tandis que ses deux dérivés inhibent avec une IC₅₀ de 12,7 ± 1,1 et 2,6 ± 0,3 μ M (**Figure 103A**). Nous avons pu également démontrer que ces trois molécules agissent selon des modes d'actions différents. D'une part, la Piperlongumine et l'un de ses dérivés agissent en inactivateur de l'activité ChT-L avec des rapports k_{obs}/[I]₀ de respectivement de 36 ± 2 M⁻¹.s⁻¹ (**Figure 103B**) et 170 ± 10 M⁻¹.s⁻¹. D'autre part, le deuxième dérivé agit en inhibiteur compétitif réversible, avec une affinité de 38.9 ± 3.8 μ M (**Figure 103C**).



Figure 103. La piperlongumine et ses dérivés inhibent préférentiellement l'activité ChT-L de l'immunoprotéasome.

(A) Profils d'inhibition de l'immunoprotéasome humain (iCP) par la Piperlongumine (1) et ses deux dérivés (2) et (4) à pH 8 and 37 °C ; (20 mM Tris, glycerol 10% -v/v-, SDS 0,01% -v/v-) ; [iCP]₀ : 0,6 nM, [Suc-LLVY-AMC]₀ : 20 μ M. (**B et C**) Mécanisme d'inhibition de l'activité ChT-L de l'immunoprotéasome par la Piperlongumine et son dérivé. (**B**) Représentation semi-logarithmique de l'activité résiduelle mesurée à différents intervalles de temps pour des concentrations croissantes en Piperlongumine en fonction du temps de pré-incubation. [iCP]₀ : 0,6 nM; [Piper.] : 0, 4 et 20 μ M. (**C**). Représentation de Dixon pour l'inhibition compétitive par le dérivé (2) ; [iCP]₀ : 0.6 nM pour des concentration croissantes en [Suc-LLVY-AMC]₀ : 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M et 80 μ M.

Contents lists available at ScienceDirect



Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome





Elodie Bosc ^{a, 1}, Jhennifer Nastri ^{b, 1}, Valérie Lefort ^a, Marilia Valli ^b, Fernando Contiguiba ^c, Renan Pioli ^d, Maysa Furlan ^b, Vanderlan da Silva Bolzani ^b, Chahrazade El Amri ^{a, **}, Michèle Reboud-Ravaux ^{a, *}

^a Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06-CNRS, IBPS, UMR 8256, Inserm ERL1164, B2A, 7 Quai Saint Bernard, F75005 Paris, France

State University - UNESP, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil

^c Institute for Natural Products Research Walter Mors, Health Sciences Center – HSC, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, 21941902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, University of São Paulo – USP, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 8 January 2018 Accepted 15 January 2018

Keywords: Piperlogumine Piperlongumine analogs Proteasome Immunoproteasome

ABSTRACT

The natural small molecule piperlongumine A is toxic selectively to cancer cells *in vitro* and *in vivo*. This toxicity has been correlated with cancer cell ROS, DNA damage and apoptotic cell death increases. We demonstrate here a new mechanistic property of piperlongumine: it inhibits selectively human immunoproteasome with no noticeable inhibition of human constitutive proteasome. This result suggests that immunoproteasome inhibition, a mechanism independent of ROS elevation, may also partly play a role in the anticancer effects observed with piperlongumine. Structure-activity relationships of piperlongumine analogs suggest that the lactam (piperidonic) ring of piperlongumine A may be replaced by the linear olefin –NHCO-CH₂=CH₂ to improve both *in vitro* inhibitory efficiency against immunoproteasome and cellular toxicity.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Piperlongumine A (PL) is an alkaloid isolated from some vegetal species of *Piper* (Piperaceae) (Fig. 1A). Several PL biological effects have been reported such as cytotoxic, genotoxic, anti-angiogenic, anti-metastatic and anti-tumor activities [1]. The natural PL molecule induces apoptosis in osteosarcoma, breast, bladder and lung cancer cells, but importantly not in normal cells [2]. A potent inhibition of breast cancer cell line migration was observed with PL analogs [3]. PL increases reactive oxygen species (ROS) and apoptotic cell death in both cancer cells and normal cells engineered to have a cancer genotype, irrespective of p53 status, with little effect in primary normal cells [4]. Using a panel of PL analogs, Adams et al. analyzed the mechanism of action of PL and suggested

¹ These authors contributed equally to this work.

that ROS-independent mechanisms, including cross-linking events, may also contribute to PL's induction of apoptosis [5]. An inhibition of the ubiquitin-proteasome system by PL was then reported by Jarvius et al. [6] but no inhibition of the 20S proteasome itself, or of 19S deubiquitinating activity was observed at concentrations inducing cytotoxicity. These observations motivated us to investigate the potential interaction between PL and proteasome. Indeed, the proteasome is now a valuable anticancer drug target [7]. This highly complex protease is formed of a 20S catalytic core particle (CP) complexed with regulatory particles such as 19S for constitutive proteasome or 11S for inducible immunoproteasome [8,9]. The CPs of both proteasomes are composed of four stacked heptameric rings with two outer rings (α 1-7) formed by the α subunits and two inner rings formed of β subunits (β 1-7). The two β 1c, two β 2c and two β 5c catalytic units of the constitutive cCP are each replaced by the β 1i, β 2i and β 3i subunits in inducible iCP. They bear caspase-like or post-acid activity (PA) for β 1, trypsin-like activity (T-L) for β 2 and chymotrypsin-like activity (ChT-L) for β 5 subunits. Considerable efforts to develop proteasome inhibitors [7,8] have been made leading to noncovalent inhibitors [10–13] or covalent ones such as

^b Nuclei of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products (NuBBE), Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Sao Paulo

^{*} Corresponding author.

^{**} Corresponding author.

E-mail addresses: chahrazade.el_amri@upmc.fr (C. El Amri), michele.reboud@ upmc.fr (M. Reboud-Ravaux).



Fig. 1. Structure of piperlogumine (PL, 1) showing the two Michael acceptor units (olefins C2-C3 and C7-C8), and reactions of syringolin and vinyl ketone derivatives with Thr10^{γ} 1 residues of cCP (A). Newly synthesized analogs of 1 (B).

the three approved drugs used in the treatment of hematologic malignancies, bortezomib (Velcade[®]) [14], carfilzomib (Kyprolis[®]) [15] and the orally administered ixazomib (Ninlaro[®]) [16]. These drugs inhibit mainly the β 5 activity of the catalytic core of the cCP but also that of the iCP by creating covalent bonds with the catalytic Thr1. When considering the chemical structure of PL (1, Fig. 1A), it appears that its non-symmetric di-vinyl imide functions implicating the double bonds C2-C3 and C7-C8 (Fig. 1A) may lead to two possibilities of Michael addition with the N-terminal nucleophilic residue Thr 10^{γ} present in all catalytic subunits of CPs. Inhibitors displaying the parent amide vinyl group such as the natural syringolin A are known to react with cCP Thr 10^{γ} to give Michael adduct (Fig. 1A) [17]. The same mechanism was observed with synthetic vinyl ketones [18]. Nevertheless, Jarvius et al. found that PL did not inhibit 20S proteasome (presumably constitutive proteasome) [6]. In the other hand, the interference of N-acetyl-Lcysteine with PL suggested that PL displays proteasome inhibitory properties [19]. In this paper, we re-examine the interaction of PL with proteasome by analyzing the inhibitory effect of PL and three of its newly synthesized analogs [3] (Fig. 1B) not only on human cCP but also human iCP. Immunoproteasome has been associated to progression of certain types of cancer, autoimmune disorders and inflammation [20]. Previous studies indicated that the 3,4,5trimethoxy cinnamic moiety of 1 does not affect its antitumor property and the C7-C8 site has a lesser electrophiliciy than the C2-C3 one [5]. We thus examined the effect of ring isomerism by replacing the PL δ-valerolactam cyclic ring by the known nucleophile trap succinimide (compound **2**) or by a non-reactive more expanded bicycle (compound 3) whereas the pharmacophore involving the C7-C8 olefin was conserved. Compound 4 showed a molecular simplification with the conserved Michael acceptor C7-C8 and double bond C2-C3, but the lactam (piperidonic) ring was removed and replaced by a linear vinyl keto group [3]. We demonstrated that the human cCP is poorly inhibited by the tested compounds whereas iCP is efficiently inhibited by 1 and two of its analogs. The mechanism by which the iCP was inhibited by the tested compounds was determined and their potential as cytotoxic tumor reagents was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Inhibitors

The isolation of PL **1** and the synthesis of compounds **2–4** are described in Ref. [3].

2.2. Enzyme activity and inhibition assays

Purified human constitutive 20S proteasome cCP and human 20S immunoproteasome iCP from erythrocytes was obtained from Boston Biochem (Cambridge, USA). The fluorogenic substrates Suc-LLVY-AMC and Z-LLE-AMC (AMC = 7-amino-4-methylcoumarin) were obtained from Bachem (Weil am Rhein, Germany). Other reagents and solvents were purchased from commercial sources. Fluorescence was measured using a BMG Fluostar microplate reader (black 96-well microplates).

Proteasome activities were determined by monitoring for 45 min at 37 °C the hydrolysis of the appropriate fluorogenic substrate Suc-LLVY-AMC (ChT-L activity) and Z-LLE-AMC (PA activity) using $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ for both substrates, in the presence of untreated (control) or treated proteasome (iCP or cCP). Substrate and compounds were previously dissolved in DMSO. The buffered reaction mixtures (pH 8.0) for both activities contain 20 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 0.01% (w/v) SDS, and 2% (v/v) DMSO. The final iPR and cPR concentrations were 0.6 nM for ChT-L and PA activities using 20 μ M Suc-LLVY-AMC (ChT-L) and 50 μ M Z-LLE-AMC (PA). Using the appropriate substrate, the compounds (0.1–100 µM) were tested in duplicate for each inhibitor concentration to detect their potential to inhibit the ChT-L and PA activities. The enzyme and the inhibitors were incubated for 20 min before the measurement of the enzyme activity. Initial rates determined in control experiments (V_0) were considered to be 100% of the peptidase activity; initial rates below 100% were considered to be inhibitions. The inhibitory activity of compounds was expressed as IC₅₀ (inhibitor concentrations giving 50% inhibition). The values of IC₅₀ were calculated by fitting the experimental data to equation (1):

% Inhibition =
$$(100 [I]_0)/(IC_{50} + [I]_0)$$
 (1)

The reversible or irreversible character was analyzed by diluting by a factor of 100 the reaction mixtures. For the reversible inhibitor **2**, a Dixon plot was used: [**2**] = 2.56–100 μ M, [iCP]₀ = 0.6 nM, [S]₀ = 10–80 μ M. For the irreversible compounds **1** and **4**, the time-dependence of the inhibition was followed by determining the remaining activity percentage at various incubation times ([iCP]₀ = 60 nM). The pseudo first-order inactivation rate constants were obtained from plots of ln(% remaining activity) vs pre-incubation time, and expressed in terms of the apparent second-order inactivation rate constants k_{obs}/[I]₀ M⁻¹ s⁻¹. The Kaleida-graph software was used for data analysis.

2.3. Cytotoxicity assays

Assays were performed on the human cancer cell line HeLa (human cervical carcinoma) obtained from ATTC. The cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Confluent cells were collected and then preincubated without inhibitor for 24 h. They were then treated during 48 h using increasing concentrations of compounds: 10 nM-50 μ M with a final DMSO concentration of 0.02% (v/v). After removal of the DMEM medium, a XTT salt solution was added for 3 h to each well (100 μ L at 0.3 mg/mL containing 8.3 mM PBS) (XTT, 2,3-bis-(2-

methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide; Cell Proliferation kit 11465015001 Roche). Absorbance at 485 nm was measured using a BMG Fluostar microplate reader. The cytotoxicity activity was expressed as the concentration inhibiting cell growth by 50% (EC₅₀) calculated from the survival curves. The experimental data were fitted to the following equation where *E* is the survival percentage, *C* the drug concentration, E_{max} the maximum drug effect, and *n* the Hill constant, which describes the shape of the curve:

$$E = 100 - (E_{\max} \ge C^n) / (C^n + EC_{50}^n)$$
⁽²⁾

The Kaleidagraph software was used for data analysis.

3. Results and discussion

3.1. Screening of PL and its analogs on cCp and iCP activities

We evaluated the capacity of compound 1 and its analogs to inhibit the ChT-L and PA activities of human cCP and iCP. Both ChT-L and PA activities of cCP were not or very poorly inhibited (less than 20% at 10 μ M and 30% at 50 μ M). Conversely, a noticeable inhibition of the ChT-L activity of iCP was observed for compounds 1, 2 and 4, and the corresponding IC50 values (concentration of inhibitor leading to 50% inhibition) were determined (Fig. 2 and Table 1). The replacement of the monocyclic δ -valerolactam R group in **1** $(IC_{50} = 15.0 \pm 1.1 \,\mu\text{M})$ by the pentacyclic succimidyl in 2 was well tolerated (IC₅₀ of $12.7 \pm 1.1 \,\mu$ M). The larger bicyclic group in **3** devoid of an electrophilic group abolished the inhibitory activity besides the presence of C7-C8 olefin. Conversely, the simplified R group that retained the aliphatic -NHCO-CH₂=CH₂ motif increased the inhibitory potency by a factor of 5.8. This higher efficiency of 4 on iCP corroborates its higher efficiency against MDA-MB-231 breast cancer cell migration analyzed using the Boyden chamber assay (EC₅₀ of $1.5 \pm 1 \,\mu$ M for **4** and of $3.0 \pm 1.0 \,\mu$ M for **1**) [3]. These results highlight the favorable role to inhibit iCP of the smaller aliphatic -- NHCO-CH₂=CH₂ group compared to the lactam piperidonic ring in 1. The absence of an electrophilic function at C2-C3 as in compound 3 seems unfavorable for such an inhibition. It failed also to inhibit cell migration at 10 µM in the wound healing MDA-MB-231 cells assay. The need of both Michael acceptors C2-C3 and C7-C8 to observe potent cell death was also reported [5].

3.2. Mechanistic studies

The reversible or irreversible character of the inhibition towards the ChT-L activity of iCP by compounds 1, 2 and 4 was analyzed. After reaction with compounds 2 and 4, no enzyme reactivation was observed after dilution (factor of 100). This was in agreement with an irreversible process. Conversely, the activity was recovered after a previous treatment of iCP with compound 2. Moreover, for this compound, increasing amounts of the ChT-L activity fluorogenic substrate reversed the inhibition process. The Dixon plot (Fig. 3A) demonstrated that compound 2 acted as a competitive inhibitor binding only to free enzyme with $K_i = 38.9 \pm 3.8 \mu M$. Conversely, a time-dependent inhibition was observed for compounds 1 and 4, and a pseudo-first process was followed during 60% of the inactivation process. The apparent second-order inactivation rate constants $k_{obs}/[I]_0$ were of $36\pm 2\,M^{-1}\,s^{-1}$ for 1 and $170 \pm 10 \,\text{M}^{-1} \,\text{s}^{-1}$ for **4**. The inactivation efficacy was increased by a factor of 4.7 for 4 compared to 1. Due to the irreversible character of the inhibition, these inactivation indexes may lead to noticeable inhibitions (for example, 97% inhibition after 30 min treatment at 10 µM for 4).



Fig. 2. Inhibition profile of the human iCP by compounds 1 (A) and 4 (B) at pH 8 and 37 °C. [iCP]₀ = 0.3 nM, ChT-L activity, [Suc-LLVY-AMC]₀ = 20 μ M. The experimental points are adjusted to equation (1).

Table 1	
Biological activities of compounds 1	

Compounds	Enzyme assays ^a IC_{50}^{b} (μ M)			Cell assays ^c EC ₅₀ ^d (µM)
	ChT-L activity		PA activity	
	сСР	iCP	сСР	
1	ni	15.0 ± 1.1	ni	2.7 ± 0.1
2	ni	12.7 ± 1.1	ni	nt
3	ni	ni	ni	nt
4	ni	2.6 ± 0.3	ni	14.0 ± 1

^a The inhibition of the human cCP and iCP at pH 8 and 37 °C was evaluated after 20 min incubation of the enzyme with the respective compound before adding the appropriate substrate (Suc-LLVY-AMC for ChT-L activity and Z-LLE-AMC for PA activity).

 b The IC₅₀ values were calculated by fitting the experimental data to eq. (1). ni, inhibition <30% at 50 μ M.

^c The cytotoxic activity was evaluated against HeLa cells after incubation for 48 h and using the XXT assay. Values in bar graphs are mean ± sd (experiments in triplicate). nt indicates no loss of viability at 50 μM.

^d The IC₅₀ values were calculated by fitting the experimental data to eq. 2.

-4



Fig. 3. Mechanisms of inhibition of the ChT-L activity of human iCP by compounds **1** and **2** at pH 8.0 and 37 °C (20 mM Tris, glycerol 10% -v/v-, SDS 0,01% -v/v-). A. Dixon plot for the competitive inhibition by compound **2**: $[iCP]_0 = 0.6 \text{ nM}$; $[Suc-LLVY-AMC]_0 = 10 \,\mu\text{M} (\bigcirc)$, $20 \,\mu\text{M} (\bigcirc)$, $40 \,\mu\text{M} (\square)$ and $80 \,\mu\text{M} (\blacksquare)$. B. Semi-logarithmic plots for residual activity measured at various intervals for increasing compound **1** concentrations as a function of preincubation time: $[iCP]_0 = 60 \,\text{nM}$; $[1] = 0 (\bigcirc)$, $4 \,\mu\text{M} (\blacksquare)$.



Fig. 4. Cytotoxicity of compounds 1 and 4 against HeLa cell line. Cells were incubated with compounds 1 and 4 in the concentration range 10 nM-50 μ M for 48 h. Cell survival was then measured using MTT assay.

3.3. Cellular toxicity

It is known that many proteasome inhibitors are toxic against HeLa cells and several tumor cell lines [7,12]. The cytotoxic effect of compounds 1-4 was evaluated on human cancer cell line HeLa (cervix) using the XTT assay. Compounds 2 and 3 were devoid of any cytotoxic effect even at 50 µM (Table 1). Survival curves yielded EC₅₀ values of $2.7 \pm 0.1 \,\mu\text{M}$ for **1** and $14.0 \pm 1 \,\mu\text{M}$ for **4** (Fig. 4, Table 1). This result was expected for compound 1 since it has been identified to be toxic selectively to cancer cells in vitro and in vivo with the EC_{50} value of 7.1 μM against HeLa cells [5]. The compound 1 antitumor efficacy was correlated with a cancer selective increase in markers of oxidative stress such as ROS, and also with DNA damage and apoptotic cell death [4,5]. Nevertheless, in some cases elevation of cellular ROS in cancer cell lines appeared insufficient to induce cell death and other cellular actions such as depletion of glutathione that was found affected [5]. In this work, we explored the potential inhibition of proteasome by PL 1 and some of its analogs. The proteasome is considered as the central hub of nonlysosomal cellular proteolysis and its inhibition leads to a large variety of cellular responses such a cell cycle arrest and increase of proapoptotic factors and tumor suppressors [21]. Our results on HeLa cell line with compound 1 suggest that the selective inhibition of iCP may also partly contribute to its observed cellular effects cancer lines. It will be also probably the case for the analog 4 despite its diminished toxicity efficacy by a factor of 5.

4. Conclusion

This work gives a direct evidence for the inhibition of iCP, but not of cCP, by piperlongumine **1** and two analogs. Upregulation of immunoproteasome has been observed in several cancers suggesting that immunoproteasome plays an important role in cancer cell survival [7]. Moreover, targeting selectively iCP may be essential in the treatment of several diseases [22]. The lack of selectivity of bortezomib and carfilzomib against cCP and iCP leads to the undesired inhibition of cCP in normal cells and in part explain the side effects and resistance observed during treatments of multiple myeloma with these drugs [23,24]. Selective inhibitors of immunoproteasome are thought to lead to clinical benefits in the treatment of several diseases such as neurodegenerative diseases, inflammation, autoimmune disorders and certain types of cancer [25]. These expected benefits explain the current focus on selective immunoproteasome inhibitors. For example, the inhibition of the β 5i subunit of iCP was found to lead benefit for the treatment of arthritis and colorectal carcinoma [26,27]. If numerous potent proteasome inhibitors have been obtained, selective inhibitors of immunoproteasome are far less numerous. Only one (compound KZR-616) that is an analog of the epoxyketone ONX094 is in clinical trial. This work demonstrates that the structural characteristics of piperlongumine A may inspire the development of original inhibitors of immunoproteasome acting through either a reversible or an irreversible mechanism. Piperlongumine analogs displaying an improved iCP inhibition may lead to therapeutical treatments involving the modulation of several targets (polypharmacolgy) since piperlongumine is known to increase reactive oxygen species and apoptotic cell death in cancer cells.

Conflicts of interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank FASPEP (Brazil) for grant fellowship for J. N. and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) for financial support of E. B. We thank Prof. J. Vidal (University of Rennes I) for fruitful discussions. Supports from the Centre National de la Recherche Scientifique and University Pierre et Marie Curie (UPMC-Sorbonne Universités) were greatly appreciated.

References

- D.P. Bezerra, C. Pessoa, M.O. de Moraes, N. Saker-Neto, E.R. Silveira, L.V. Costa-Lotufo, Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine), Eur. J. Pharmaceut. Sci. 48 (2013) 453–463.
- [2] A. Glasauer, N.S. Chandel, Targeting antioxidants for cancer therapy, Biochem. Pharmacol. 92 (2014) 90–101.
- [3] M. Valli, W. Altei, R.N. dos Santos, E.C. de Lucca Jr., M.A. Dessoy, R.M. Pioli, F. Cotinguiba, X. Cachet, M. Furlan, L.C. Dias, A.D. Andricopulo, V.S. Bolzani, Synthetic analogue of the natural product piperlongumine as a potent inhibitor of breast cancer cell line migration, J. Braz. Chem. Soc. 28 (2017) 475–484.
- [4] L. Raj, T. Ide, A.U. Gurkar, M. Foley, M. Schenone, X. Li, N.J. Tolliday, T.R. Golub, S.A. Carr, A.F. Shamji, A.M. Stern, A. Mandinova, S.L. Schreiber, S.W. Lee, Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS, Nature 475 (2011) 231–234.
- [5] D.J. Adams, M. Dai, G. Pellegrino, B.K. Wagner, A.M. Stern, A.F. Shamji, S.L. Schreiber, Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 15115–15120.
- [6] M. Jarvius, M. Fryknas, P. D'Arcy, C. Sun, L. Rickardson, J. Gullbo, C. Haglund,

P. Nygren, S. Linder, R. Larsson, Piperlongumine induces inhibition of the ubiquitin-proteasome system in cancer cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 431 (2013) 117–123.

- [7] P.M. Cromm, C.M. Crews, The proteasome in modern drug discovery: second life of a highly valuable drug target, ACS Cent. Sci. 3 (2017) 830–838.
- [8] P. Sledz, W. Baumeister, Structure-driven developments of 26S proteasome inhibitors, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56 (2016) 191–209.
- [9] G.A. Collins, A.L. Goldberg, The logic of the 26S proteasome, Cell 169 (2017) 792–806.
- [10] A. Desvergne, E. Genin, X. Marechal, N. Gallastegui, L. Dufau, N. Richy, M. Groll, J. Vidal, M. Reboud-Ravaux, Dimerized linear mimics of a natural cyclopeptide (TMC-95A) are potent noncovalent inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome, J. Med. Chem. 56 (2013) 3367–3378.
- [11] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, Hydroxyureas as noncovalent proteasome inhibitors, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 51 (2012) 247–249.
- [12] E. Genin, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry, Curr. Top. Med. Chem. 10 (2010) 232–256.
- [13] X. Marechal, E. Genin, L. Qin, O. Sperandio, M. Montes, N. Basse, N. Richy, M.A. Miteva, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, B.O. Villoutreix, 1,2,4-Oxadiazoles identified by virtual screening and their non-covalent inhibition of the human 20S proteasome, Curr. Med. Chem. 20 (2013) 2351–2362.
- [14] J. Adams, M. Kauffman, Development of the proteasome inhibitor Velcade (bortezomib), Canc. Invest. 22 (2004) 304–311.
- [15] J.J. Shah, E.A. Stadtmauer, R. Abonour, A.D. Cohen, W.I. Bensinger, C. Gasparetto, J.L. Kaufman, S. Lentzsch, D.T. Vogl, C.L. Gomes, N. Pascucci, D.D. Smith, R.Z. Orlowski, B.G. Durie, Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone for relapsed or refractory myeloma, Blood 126 (2015) 2284–2290.
- [16] P. Moreau, T. Masszi, N. Grzasko, N.J. Bahlis, M. Hansson, L. Pour, I. Sandhu, P. Ganly, B.W. Baker, S.R. Jackson, A.M. Stoppa, D.R. Simpson, P. Gimsing, A. Palumbo, L. Garderet, M. Cavo, S. Kumar, C. Touzeau, F.K. Buadi, J.P. Laubach, D.T. Berg, J. Lin, A. Di Bacco, A.M. Hui, H. van de Velde, P.G. Richardson, T.-M.S. Group, Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple

myeloma, N. Engl. J. Med. 374 (2016) 1621-1634.

- [17] J. Clerc, B.I. Florea, M. Kraus, M. Groll, R. Huber, A.S. Bachmann, R. Dudler, C. Driessen, H.S. Overkleeft, M. Kaiser, Syringolin A selectively labels the 20 S proteasome in murine EL4 and wild-type and bortezomib-adapted leukaemic cell lines, Chembiochem 10 (2009) 2638–2643.
- [18] D.S. Hewings, J.A. Flygare, I.E. Wertz, M. Bogyo, Activity-based probes for the multicatalytic proteasome, FEBS J. 284 (2017) 1540–1554.
- [19] M. Halasi, M. Wang, T.S. Chavan, V. Gaponenko, N. Hay, A.L. Gartel, ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors, Biochem. J. 454 (2013) 201–208.
- [20] M. Groettrup, C.J. Kirk, M. Basler, Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? Nat. Rev. Immunol. 10 (2010) 73–78.
- [21] A. Ciechanover, J.A. DiGiuseppe, B. Bercovich, A. Orian, J.D. Richter, A.L. Schwartz, G.M. Brodeur, Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 139–143.
- [22] A.V. Singh, M. Bandi, M.A. Aujay, C.J. Kirk, D.E. Hark, N. Raje, D. Chauhan, K.C. Anderson, PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo, Br. J. Haematol. 152 (2011) 155–163.
- [23] D. Niewerth, G. Jansen, Y.G. Assaraf, S. Zweegman, G.J. Kaspers, J. Cloos, Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies, Drug Resist. Updates 18 (2015) 18–35.
- [24] E.E. Manasanch, R.Z. Orlowski, Proteasome inhibitors in cancer therapy, Nat. Rev. Clin. Oncol. 14 (2017) 417–433.
- [25] G. Kaur, S. Batra, Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology, Immunol. Cell Biol. 94 (2016) 812–820.
- [26] J. Koerner, T. Brunner, M. Groettrup, Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice, Oncotarget 8 (2017) 50873–50888.
- [27] T. Muchamuel, M. Basler, M.A. Aujay, E. Suzuki, K.W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E.R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S.D. Demo, M.K. Bennett, C.J. Kirk, M. Groettrup, A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis, Nat. Med. 15 (2009) 781–787.
I. Propriétés enzymologiques de la Caspase-2

Afin d'affiner les conditions de mesure de l'activité de la CASP-2, nous avons entrepris quelques optimisations des conditions expérimentales.

Nous avons d'abord confirmé dans nos conditions expérimentales que la CASP-2 nécessite la reconnaissance d'une séquence pentapeptidique, notamment VDVAD, pour exercer efficacement son activité de clivage, conformément aux travaux de travaux de Thornberry N.A. *et al.*, ; Talanian R.V. *et al.*, 1997. Cependant, comme nous l'avions évoqué en introduction, cette singularité ne lui confère pas de sélectivité *vis-à-vis* de ce motif puisque la CASP-3 est aussi capable de reconnaître et cliver efficacement ce motif VDVAD.

Nous avons également pu mettre en évidence qu'au même titre que les CASP-8 et -9 l'activité de la CASP-2 est considérablement augmentée in vitro en présence de certains sels et notamment du succinate de sodium (Chauvier et al, 2011). Pour les CASP-8 et -9 l'ajout de 1 M de citrate de sodium permet d'augmenter de 100 fois l'activation des monomères de Caspase in vitro (Boatright K.M. et al., 2003.; Pop C. et al., 2008). Ces agents dit « cosmotropiques », ont un rôle dual. D'une part, ils permettent de lever la barrière entropique pour favoriser la formation et la stabilisation des dimères in vitro, tel est le cas pour les CASP-8 et -9. D'autre part, ils peuvent, comme dans notre système, moduler la flexibilité des boucles au niveau du site actif (Pop C. et al., 2008). Cette organisation des boucles, en créant des réseaux avec des molécules d'eau par exemple, permet de diminuer l'entropie et de favoriser la fixation du substrat. Ces sels ont donc un effet direct sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Une telle activation par les sels est également rapportée pour d'autres protéases. En effet, l'activité de la protéase du Poliovirus 3C est 100 fois augmentée en présence de 1,5 M de citrate de sodium, cette activation en présence de sels serait la conséquence d'interaction faibles qui conduiraient à un réarrangement au niveau des boucles flexibles du site actif pour stabiliser le substrat dans sa forme à l'état de transition (Gouvea I.E. et al., 2006). D'autres activations par les sels associés à des changements conformationnels sont également rapportées notamment pour la Kallicréine 3, aussi connue sous le nom d'antigène prostatique spécifique (Huang X. et al., 2001). Un autre membre de cette famille de protéase à Sérine, la kallikréine 6 (KLK 6), est également fortement activée en présence d'1

M de citrate de sodium. Pour celle-ci, en revanche, cette activation ne se traduit pas par des changements conformationnels majeurs (Angelo P.F. *et al.*, 2006).

II. L'efficacité vs la sélectivité

A. Peptides aldéhydes comme inhibiteurs de la Caspase-2

Dans ce manuscrit, nous sommes attachés à retracer et à étudier les mécanismes d'inhibition des principaux peptides inhibiteurs de Caspases de manière quantitative. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux peptides aldéhydes et nous avons pu confirmer qu'il s'agissait d'inhibiteurs réversibles qui agissent selon un mode compétitif du substrat vis-à-vis du site actif de l'enzyme cible. Ce mode d'action n'est pas surprenant pour ces molécules qui sont des analogues de substrats et qui se comportent donc comme tels. Par conséquent, la saturation de l'enzyme par un excès de substrat permet de lever l'effet inhibiteur de ces peptides aldéhydes. Nous avons également pu mettre en évidence pour la première fois que le peptide Ac-VDVAD-CHO est un inhibiteur efficace de la CASP-2 avec un Ki de 6 nM. Cependant le motif VDVAD est aussi très bien reconnu par la CASP-3 (Ki = 8 nM). Par conséquent, l'inhibiteur est aussi très efficace sur cette dernière. Nous avons également confirmé que le peptide aldéhyde Ac-DEVD-CHO a une très bonne affinité pour la CASP-3 avec un Ki de 0,2 nM, conformément aux données de la littérature (Garcia-Calvo M. et al., 1998). La CASP-2 a une moins bonne affinité pour ce peptide avec un Ki de 3,2 µM, soit un effet deux fois plus faible que celui obtenu par Garcia-Calvo M. *et al.*, en 1998 (Ki = 1,7 μ M). Nous confirmons donc que la CASP-2 est inhibée plus efficacement par le motif pentapeptidique VDVAD que par le tétrapeptide DEVD.

Pour les mécanismes d'action des inhibiteurs, il est à noter que la Cystéine n'est pas préalablement activée par l'histidine, comme c'est le cas pour les protéases à Sérine (Kraut J. 1977) : pour les Caspases, la Cys-285 de l'His-237 sont séparées de 5,2 Å. Ceci remet en cause le fait que la cystéine soit pré-polarisée en amont de la réaction, qui tendrait plutôt vers un nucléophile qui se développerait au cours de la réaction. Cette hypothèse est en accord avec le pH optimal d'activité des Caspases qui se situe entre 6.4 et 7.4 (pKa_{Cys} = 8,4). Stenncikes H.R. *et al.,* 1999. De plus, les aldéhydes ne semblent pas se lier dans une conformation de l'état de transition, où classiquement l'oxyanion du thio-hémiacétal est stabilisé au niveau du trou oxyanion formé par la cystéine catalytique et un résidu Glycine (Garcia-Calvo M. *et al.,* 1998).

L'oxyanion est donc stabilisé par l'établissement de liaisons hydrogènes notamment avec l'His catalytique. Enfin, comme nous l'avions évoqué en introduction, d'un point de vue pharmacologique, les peptides aldéhydes présentent un faible potentiel thérapeutique compte tenu de leur faible stabilité. De plus, la forte réactivité de l'aldéhyde entraîne des réactions croisées avec d'autres bionucléophiles, impactant considérablement la sélectivité dans un contexte cellulaire. Nous avons d'ailleurs également confirmé ces effets croisés *in vitro* sur les Cathepsines B et L, avec des efficacités d'inhibition de l'ordre du micromolaire.

B. Peptides dérivés de cétones : halométhyl-cétone et acyloxyméthylcétone

Au départ, en raison de la faible réactivité de la liaison carbone-fluor, les peptides fluorométhyl-cétones ont été développés comme des inhibiteurs réversibles potentiels de l'état de transition pour les protéases à Sérine, tel a été le cas pour les trifluorométhyl-cétone (Powers J.C. et al., 2002). Cependant les peptides fluorométhyl-cétones se sont très vite avérés être des inhibiteurs irréversibles et efficaces des protéases à cystéine tandis qu'ils sont de très faibles inactivateurs irréversibles des protéases à Sérine. Par conséquent, les fluorométhyl-cétones sont en général de bons inhibiteurs des protéases à Cystéine tandis que les chlorométhyl-cétones avec les séquences appropriées sont généralement décrits comme des inhibiteurs de protéases à Sérine dans la littérature. Toutefois ces inhibiteurs sont aussi capables d'inhiber l'activité Caspase. Dans nos résultats, nous avons en effet pu mettre en évidence que les fluorométhyl-cétones z-VAD-fmk et z-VDVAD-fmk étaient des inhibiteurs efficaces des CASP-2 et -3 avec des rapports k_{inact}/K₁ compris entre 6.000 et 20.000 M⁻¹.s⁻¹ pour z-VDVAD-fmk. Pour le composé z-VAD(OMe)-fmk, classiquement utilisé dans les données de la bibliographie, nous avons trouvé un effet similaire sur la CASP-2 avec un rapport kinact/Ki de 601 contre 290 M⁻¹.s⁻¹ obtenus par Garcia-Calvo M. *et al.*, 1998. De manière étonnante, nous avons en revanche obtenu un efficacité beaucoup plus faible, de 777 M⁻¹.s⁻¹ sur la CASP-3 contre un rapport de 16.000 M⁻¹.s⁻¹ publié par la même équipe. Ces différences peuvent s'expliquer par une divergence des conditions expérimentales. Toutefois, ces valeurs coïncident avec le fait que CASP-3 reconnait préférentiellement un motif tétrapeptidique DEVD.

La présence du motif préférentiellement reconnu par la CASP-2 fait que le composé z-VDVAD-fmk est deux fois plus efficace sur cette dernière. Toutefois, la conservation de la

structure des sites actifs entre les CASP-2 et -3 est une nouvelle fois un obstacle à la sélectivité puisque le composé est encore plus efficace sur la CASP-3. Contrairement à Ac-VDVAD-CHO qui a un effet équivalent sur les deux enzymes, z-VDVAD-fmk est 3 fois plus fort sur la CASP-3. Cette différence dans l'effet peut être la cause de la nature des groupements en amino et carboxy-terminaux qui peuvent influencer la reconnaissance et l'effet sur la CASP-2.

Les fluorométhyl-cétones ne sont pas réactifs *vis-à-vis* de bionucléophiles tels que le glutathion. De ce fait, ils sont très utilisés *in vitro* et *in vivo*, contrairement aux composés chlorométhyl-cétones qui ont une forte réactivité sur le glutathion (Angliker H., *et al.*, 1987). Cependant, les fluorométhyl-cétones sont aussi de très bons inhibiteurs des autres protéases à cystéine. Ils sont notamment de très puissants inactivateurs de la Cathepsine B avec des efficacités inhibitrices allant jusqu'à 390.000 M⁻¹.s⁻¹ pour le composé Cbz-FR-fmk. D'ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que le composé z-VAD-fmk est un inhibiteur efficace de la Cathepsine B avec un rapport k_{inact}/K_I d'environ 2.000 M⁻¹.s⁻¹. Ces effets croisés sur la Cathepsine B, associés à la métabolisation du composé conduisant à la libération de fluoroacétate *in vivo*, font que ces composés n'ont pas été exploités pour la suite du *design*.

Les acyloxyméthyl-cétones ont été développées par Allan Krantz et ses collègues, dans le but que le groupement électrophile acyloxyméthyl-cétone soit réactif vis-à-vis du nucléophile du site actif de l'enzyme cible sans aucune réactivité sur les autres biomolécules (Krantz A. et al., 1991). Par exemple, le composé Ac-YVAD-CH2-OC(O)Ar a été identifié comme puissant inhibiteur de la CASP-1 avec une efficacité d'inhibition de 1.10⁶ M⁻¹.s⁻¹ et avec une reconnaissance du glutathion évaluée à moins de 5.10⁻⁴ M⁻¹.s⁻¹ (Thornberry N.A. *et al.*, 1994). Parmi eux, le composé Q-VD-OPh est un inhibiteur aux propriétés pharmacologiques intéressantes. En effet, la présence d'un groupement carboxy-quinolyl en N-ter permet d'accroître la perméabilité membranaire du composé et notamment in vivo, aucune toxicité n'a pu être mise en évidence pour le groupe partant di-fluorophénol. En étudiant la sélectivité de ce composé sur les Cathepsines B, L et D, nous avons montré qu'il s'agissait d'un inactivateur modérément efficace des Cathepsines B et L avec des rapports kinact/KI compris entre 25 et 40 M⁻¹.s⁻¹. Par conséquent, le composé Q-VD-OPh exerce des effets croisés nettement plus faibles que le z-VAD-fmk. En termes d'activité sur les CASP-2 et -3, le Q-VD-OPh est un excellent inhibiteur de la CASP-3 avec un efficacité de 167.000 M⁻¹.s⁻¹, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les données référencées dans la bibliographie (200.052 M⁻¹.s⁻¹; O' Brien T et al.,. Design of caspase inhibitors as potential Clinical). La nature du

groupement en N-ter pourrait expliquer cette hausse considérable. En effet, pour les composés fmk, la puissance de l'inhibition varie également en fonction de la nature du groupement en N-ter. Il n'est donc pas étonnant de voir que le composé Q-VD-OPh soit puissant vis-à-vis de la CASP-3, par comparaison avec le composé z-VAD-fmk. De plus, la nature du groupement en C-ter peut aussi jouer un rôle dans cette hausse du pouvoir inhibiteur. En effet, la réactivité liée à la nature du groupement électrophile en C-terminal, peut considérablement impacter l'efficacité des composés. En revanche, nous avons démontré que le composé Q-VD-OPh agissait beaucoup plus faiblement sur la CASP-2 avec une efficacité de 907 M⁻¹.s⁻¹. Ces données sont en désaccord avec les résultats publiés par Chauvier D. et al., en 2007, dans lesquels un effet inhibiteur de l'ordre du nanomolaire sur la CASP-2, avec une IC₅₀ de 80 nM, a été mis en évidence. Finalement, il n'est pas étonnant de voir qu'un di-peptide ne soit pas efficace sur cette enzyme compte tenu de ses spécificités de reconnaissance. En revanche, le peptidomimétique Emricasan, démontre une inhibition efficace de la CASP-2 avec un rapport de 75.300 M⁻¹.s⁻¹. Celui-ci est également un puissant inhibiteur de la CASP-8 (2 940 000 M⁻¹.s⁻¹), de la CASP-9 ainsi que de la CASP-1 (689 000 M⁻¹.s⁻¹) ¹) (Linton S.D. et al., 2005). Nous n'avons malheureusement pas pu confirmer ces résultats au cours de la thèse. C'est également un inhibiteur efficace de la CASP-3 (75 700 M⁻¹.s⁻¹). Pour cette dernière affirmation, nous avons obtenu un effet deux fois plus faible sur l'activité CASP-3 avec un rapport k_{inact}/K_I de 32.658 M⁻¹.s⁻¹. La différence des conditions expérimentales pourrait là-encore être à l'origine de ce différentiel dans l'effet. L'efficacité de l'inhibition sur la CASP-2 peut s'expliquer par la nature du groupement en N-ter qui pourrait s'ancrer au niveau d'un des sous-sites du site actif de la CASP-2.

Enfin, nous avons confirmé qu'un résidu Asp en P1 est essentiel pour une inhibition efficace par les Caspases. En effet, l'activité CASP-2 n'est pas impactée par Q-VE-OPh. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence que la CASP-3 était faiblement inactivée par le composé. Cependant, cet effet ne pourrait-il pas être la conséquence d'une reconnaissance non spécifique des groupements en N-ter et C-ter compte tenu de la spécificité de clivage des Caspases. Toutefois, il a pu être montré que les CASP-3 et -7 sont capables de cliver après un résidu Glutamate (Seaman J.E. *et al.*, 2016). Pour répondre à ces interrogations, il faudrait utiliser un motif de référence tel que le DEVD et voir l'effet d'un remplacement de l'Aspartate par un Glutamate sur l'efficacité de l'inhibition. Au cours de la thèse, nous avons fait synthétiser un peptide substrat Ac-VDVAE-AMC. Malheureusement après plusieurs tentatives,

nous n'avons pas pu obtenir d'activité Caspases avec le substrat de référence (Ac-VDVAD-AMC) synthétisé en parallèle.

C. Mécanisme d'action des inhibiteurs irréversibles de Caspases

Comme dans la littérature, nous avons pu confirmer que ces composés, fluorométhylcétones et acyloxyméthyl-cétones agissent en inhibiteurs irréversibles. Sans études structurales, nous avons proposé deux mécanismes d'action en se basant sur la structure des peptides et sur les données bibliographiques en matière de réactivité chimique. De manière générale, ces composés peuvent agir selon deux mécanismes pour conduire à la formation de l'adduit thioéther, ce sont donc des agents alkylants de la cystéine catalytique. Dans tous les cas, a lieu la formation rapide d'un complexe non covalent Enzyme-Inhibiteur (complexe de Michaelis) qui aboutit à la formation d'un adduit thioéther (EI*) associé à la libération du groupe partant. Entre ces deux étapes peut avoir lieu la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal (E-I). Dans un cas, le complexe de Michaelis conduit à l'attaque directe du CH₂ par le thiolate de la cystéine catalytique pour former le produit thioéther (El*). Dans un deuxième cas, un intermédiaire thiohémiacétal est le précurseur du produit final EI* (Wang Z. et al., 2010). Les données cristallographiques de la CASP-3 avec le composé Ac-DVAD-fmk soutiennent les deux mécanismes. L'oxygène du carbonyle forme une liaison hydrogène avec le proton de l'amide de la Glycine qui forme une partie du trou oxyanion, d'une part. La structure de l'adduit formé est un thioéther, d'autre part (Mittl P.R. et al., 1997). Pour les acyloxyméthyl-cétones, l'établissement d'une thioéther cétone sur les protéases à Cystéine, dont les Caspases, a pu être mis en évidence (Powers J.C. et al., 2002)

Il existe majoritairement deux types d'inhibiteurs irréversibles, les molécules dont l'inhibition est basée sur le mécanisme, on parle de substrat « suicide », et les inhibiteurs marqueurs par affinité (Berg J.M. *et al.,* 2002). Les molécules appartenant à la première catégorie de molécules se fixent à leur cible et sont reconnues comme un substrat. L'initiation de la catalyse entraîne l'activation d'un groupement hautement réactif, tel est le cas pour l'inhibition de la kallicréine 6 par les dérivés 6-substituté-coumarin-3-carboxylates (Soualmia F. *et al.,* 2018). Pour le marquage par affinité, les inhibiteurs démontrent une spécificité d'action envers un résidu catalytique. Ces molécules agissent en analogues de substrats pour favoriser la liaison au site actif. Elles possèdent dans leur séquence un groupement réactif, typiquement électrophile qui réagit avec la cystéine, nucléophile du site actif. Ce type

d'inhibiteur possède un seul site saturable et réagit de manière stœchiométrique. Comme pour les peptides aldéhydes, l'enzyme est protégée par un excès de substrat (*non démontré dans nos tests*). L'inhibition est accompagnée d'une modification covalente de l'enzyme puisque l'inhibiteur reste lié à la protéine, après dilution ou après traitement avec un puissant nucléophile.

Les composés chlorométhyl-cétones sont connus pour être des marqueurs d'affinité (Shaw E. *et al.,* 1965). C'est également le cas pour les acyloxyméthyl-cétones (OPh). Pour l'inhibiteur z-[AA2]-[AA1]-CH2OCOAr (AA : Acide aminé), le dipeptide sert de groupement d'affinité et est complémentaire des sous-sites S1 et S2 de l'enzyme d'intérêt, en l'occurrence la Cathepsine B. L'unité acyloxyméthyl-cétone contient un groupement partant faible, sous la forme d'un carboxylate nucléofuge, et constitue le groupement réactif qui marque l'enzyme (Krantz A. *et al.,* 1991). Ces inhibiteurs sont dépendants du temps, ciblent le site actif et inhibent l'enzyme de manière irréversible. D'après ces informations, nous pouvons supposer que les inhibiteurs généraux de Caspases agissent comme marqueurs d'affinité compte tenu de leurs propriétés structurales. Le potentiel inhibiteur de nos composés est ainsi basé sur l'affinité de l'enzyme pour la portion peptidique de la molécule ainsi que sur la nature du groupe partant, ici difluorophénol, ou fluorure. Une expérience complémentaire où l'on évaluerait l'effet d'une augmentation de la concentration en substrat sur l'efficacité inhibitrice pourrait apporter des informations complémentaires.

III. Inhibiteurs aux motifs VDVAD : Efficacité sans sélectivité

Les composés TRP-901, TRP601 et son métabolite déméthylé le Δ 2Me-TRP601 sont issus d'une série de molécules développées par la société Theraptosis[®]. Dans cette série composée de peptides et de petites molécules applicables à divers champs thérapeutiques, des inhibiteurs de Caspases ont également été conçus. Le point commun de ces molécules était leurs *design* basé sur les motifs tétra et pentapeptidiques préférentiellement reconnus par les Caspases, inspiré de la chimie du Q-VD-OPh et de celle de l'Emricasan. Dans cette série d'inhibiteurs, seules les molécules qui possédaient une séquence VDVAD, à savoir TRP601 et Δ 2Me-TRP601, visaient une inhibition préférentielle des Caspases du groupe II (-2, -3, -7). L'étude de ces deux composés nous a permis de confirmer que la séquence VDVAD encadrée par les groupements amino et carboxy-terminaux du Q-VD-OPh permettait d'accroître

considérablement le pouvoir des inhibiteur sur les CASP-2 et -3 in vitro, avec des rapports k_{inact}/K_1 de 1,2 .10⁶ et 1,6.10⁶ M⁻¹.s⁻¹ respectivement, pour le meilleur composé Δ 2Me-TRP601. Les résultats que nous avons obtenus sont différents de ceux obtenus par Chauvier et al., en 2011, qui avait pu mettre en évidence que les rapports k_{inact}/K_I sur les CASP-2 et -3 pour le même inhibiteur étaient de respectivement 182.801 et 34.782.163 M⁻¹.s⁻¹. La différence dans les ratios peut être la conséquence de la diversité des techniques employées pour l'analyse des cinétiques enzymatiques. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus semblent aussi cohérents puisque comme nous l'avons démontré pour les précédentes séries d'inhibiteurs, le motif VDVAD est aussi bien reconnu par la CASP-2 que par la CASP-3, avec un effet préférentiel sur la CASP-3 pour les équivalents irréversibles. Ici, nous avons donc obtenu des effets dans le même ordre de grandeur avec un pouvoir légèrement plus fort sur la CASP-3. En revanche, pour le composé TRP601, l'équivalent méthylé sur les Aspartate du ∆2Me-TRP601, les données que nous avons obtenues sont dans le même ordre de grandeur avec un $k_{inact}/K_1 5.346 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ contre 1.243 $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ publié pour la CASP-2 et de 21.252 $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ contre 36.025 M⁻¹.s⁻¹ publié sur la CASP-3. Enfin, nous avons montré que le composé Q-D(OMe)E OMe)VD(OMe)-OPh (TRP-901) inhibe très efficacement la CASP-3 avec une efficacité de 223.684 M⁻¹.s⁻¹ contrairement à la CASP-2 qu'il inhibe avec une efficacité de 1.200 M⁻¹.s⁻¹. De plus, sur la CASP-3, nous pouvons supposer que si le peptide TRP-901 était déméthylé, l'effet du composé Q-DEVD-OPh serait nettement supérieur à celui du Δ 2Me-TRP601.

Enfin, nous avons évalué la sélectivité du composé Δ 2Me-TRP601 sur les Cathepsines et la CASP-6. Nous avons pu mettre en évidence que ce composé n'a pas d'effet sur les Cathepsines B, L et D mais qu'il inhibait efficacement la CASP-6 avec une efficacité de 4.706 M^{-1} .s⁻¹. L'effet étant nettement moins efficace que sur les CASP-2 et -3, nous confirmons qu'il s'agit bien d'un inhibiteur préférentiel de ces enzymes. Toutefois, des études complémentaires doivent être étendues à d'autres Caspases pour affiner le répertoire de protéases ciblés par ces peptides. Compte tenu de la mauvaise solubilité du composé TRP601 dans nos conditions expérimentales, l'étude de la sélectivité n'a pas été menée plus en aval. Cependant, Chauvier *et al.*, en 2011 avaient démontré le composé n'altérait pas de manière significative l'activité de 56 enzymes testées à 10 μ M, parmi lesquelles : des kinases, des phosphatases, des protéases à sérine, cystéine et aspartate, des enzymes du métabolisme etc,... . De plus, à une telle concentration, le composé n'impacte pas non plus la liaison du ligand à 110 récepteurs, canaux ou transporteurs testés.

L'ensemble de ces résultats confirme une nouvelle fois que la CASP-2 nécessite la reconnaissance du pentapeptide VDVAD pour être efficacement inhibée. Toutefois, ce motif n'est pas suffisant pour aboutir à une sélectivité envers cette enzyme puisque la CASP-3 est inhibée encore plus efficacement, que ce soit par les composés z-VDVAD-fmk ou Δ 2Me-TRP601.

IV.Effet des variations en P2 du motif VDVAD sur la sélectivité

Suite à une étude comparative de la topologie des sous-sites actifs des CASP-2 et -3, Maillard M.C. et ses collègues en 2011 ont développé par une approche rationnelle une série de peptides aldéhydes conçus pour inhiber préférentiellement l'activité CASP-2. Dans leur étude, ils avaient alors montré que la différence entre les sites actifs des CASP-2 et -3 se concentre exclusivement au niveau du sous-site S2, où une Tyrosine fait place à une Alanine chez la CASP-2. Ils avaient donc supposé qu'un résidu encombrant, à la place de l'Alanine en P2 du motif de référence VDVAD, pourrait permettre à l'inhibiteur de se loger dans le site actif de CASP-2 mais qu'une gêne stérique avec la Tyrosine en S2 du site actif de la CASP-3 empêcherait sa bonne fixation. Nous avons donc étudié de manière approfondie quatre molécules issues de cette série, du point de vue mécanistique. Ces molécules diffèrent par la nature du maillon organique en P2. Les molécules c33, k33 et h33, sont toutes des dérivés de (S)-Proline. Plus précisément c33 est un analogue 3-(S)-isopropoxyl ((S)-proline substituée avec un groupement $-OCH(CH_3)_2$); h33 et k33 possèdent respectivement une (S)-Proline substituée avec un néopentyl (- $CH_2C(CH_3)_3$) et un cyclohexyl. En revanche, q33 présente une isoquinoline en position P2 substituée en C-7 avec un groupement méthyle. Sur la CASP-2, le composé c33 est le moins efficace avec un Ki de 122 nM tandis que le composé h33 est le plus efficace avec un Ki de 10,9 nM. En position 3 de la Proline, le remplacement de l'oxygène par un carbone pourrait expliquer la différence de l'effet entre ces deux molécules. En effet, le carbone à cette position pourrait établir davantage de contacts avec la Phe-279 du sous-site S2, plutôt que l'oxygène à cette même position. Sur h33, la chaîne –CH2-C-(CH₃)₃ forme une «pince» hydrophobe qui va pouvoir s'ancrer dans le sous-site S2 relativement hydrophobe de la CASP-2. En effet, ce sous-site S₂ est composé des chaînes latérales d'une Alanine, Methionine et d'une Phenylalanine. En termes d'efficacité, le composé q33 se positionne en deuxième meilleur inhibiteur de la CASP-2 (Ki = 26,7 nM). Cet effet peut être expliqué par le fait que l'isoquinoline en P2 soit stabilisée via l'établissement de contacts hydrophobes avec

le sous-site S2, relativement apolaire. Contrairement à la CASP-2 où les composés ont une efficacité de l'ordre du nanomolaire, les molécules ont des affinités de l'ordre du micromolaire envers la CASP-3. De plus, h33 est le moins efficace sur la CASP-3 avec un Ki de 6,5 μM. Au niveau du sous-site actif de la CASP-3, la pince que forme le groupement néopentyl- pourrait être gênée par la chaîne latérale de la Tyrosine du sous-site S2 de la CASP-2. Ceci expliquerait la plus faible efficacité de ce composé. Le composé q33 a également un effet préférentiel envers la CASP-2 avec un index de sélectivité de 85. La présence de l'isoquinoline en P₂ pourrait justifier ce gain, puisque le groupement aromatique isoquinoline pourrait être stabilisé *via* l'établissement de contacts hydrophobes avec le sous-site S2, relativement apolaire. La moindre efficacité sur la CASP-3, l'encombrement stérique généré par la chaîne latérale de la Tyrosine pourrait empêcher l'isoquinoline de se placer. D'autre part, l'hydroxyle de la Tyrosine pourrait empêcher le bon positionnement de ce groupement apolaire au niveau de ce sous-site S2.

Il est également à noter que les extrémités C-ter des peptides aldéhydes ont été modifiées pour améliorer la stabilité des peptides dans un contexte cellulaire. Par conséquent, la libération de l'aldéhyde pourrait avoir un effet bénéfique sur l'efficacité de ces composés visà-vis de la CASP-2 *in vitro* au même titre que le TRP601 et son métabolite déméthylé.

Ces molécules, comme les Ac-VDVAD-CHO et Ac-DEVD-CHO, sont des inhibiteurs réversibles qui établissent un lien covalent transitoire avec la Cystéine catalytique. En tant qu'analogues de substrats, ces derniers agissent en compétiteurs du substrat naturel *vis-à-vis* du site actif de l'enzyme. Leur effet inhibiteur est donc levé par un excès de substrat. Dans cette partie, nous avons donc validé dans nos conditions expérimentales que les molécules issues de la conception rationnelle de Maillard M.C. *et al.*, 2011 permettent d'augmenter considérablement la sélectivité en faveur de la CASP-2. De plus cette sélectivité est associée à une efficacité *in vitro* de l'ordre du nanomolaire.

V. Nouvelle série « LJ » : quand efficacité rime avec sélectivité

La nouvelle série de molécules LJ est issue d'une conception rationnelle basée sur les propriétés pharmacocinétiques du composé Q-VD-OPh, l'efficacité inhibitrice du composé Δ 2Me-TRP601 ainsi que sur la sélectivité des composés h33 et q33. La série « LJ » a été obtenur en associant les atouts de chacune de ces molécules.

A. LJ4a et LJ5a - Aldéhyde remplacé : efficacité et sélectivité diminuées Afin de palier à la réactivité de l'aldéhyde dans un contexte cellulaire, l'extrémité thiazozylméthyle de l'inhibiteur de la protéase du VIH, le Ritonavir, a été utilisée comme groupement électrophile des composés LJ4a/b et LJ5a/b. Le Ritonavir est un analogue de l'état de transition qui inhibe de manière non covalente la protéase du VIH. Ce composé est approuvé par la *Food Drug and Administration* depuis 1996 pour la prise en charge des infections à VIH (Kempf D.J. *et al.*, 1998 ; Lv Z. *et al.*, 2015). Il est aujourd'hui utilisé comme potentialisateur d'autre inhibiteurs de la protéase du VIH en raison de sa capacité à inhiber le cytochrome P450 3A4 (Sevrioukova I.F. *et al.*, 2010).

LJ4a possède le maillon organique du composé q33, c'est-à-dire l'isoquinoline substituée en c-7 avec un groupement méthyle. Le composé LJ5a possède quant à lui la proline fonctionnalisée avec le neopentyl- du h33. Le premier constat que nous avons pu faire est qu'il y a un réel effet de la configuration du carbone α en P2. Les composés les plus efficaces sont les stéréoisomères (S). Sur la CASP-3 aucun profil d'inhibition intéressant des composés LJ4b et 5b n'a été mis en évidence à 10 μ M. Les composés LJ4a et LJ5a ont des efficacités inhibitrices de l'ordre du micromolaire sur les CASP-2 et -3. Pour le composé LJ4a, l'effet est préférentiel en faveur de la CASP-2 avec un Ki de 2,5 µM contre 65 µM sur la CASP-3. L'index de sélectivité en faveur de la CASP-2 est ainsi de 26. En revanche pour le composé LJ5a, qui partage les propriétés structurales du h33, les effets sur les CASP-2 et -3 sont identiques avec une efficacité de 5 µM. Par conséquent, en plus d'être beaucoup moins efficace que les composés h33 et q33 initiaux, la sélectivité en faveur de la CASP-2 est également considérablement diminuée voir annulée pour le composé LJ5a. Ce différentiel dans l'effet est très certainement la conséquence du remplacement de l'aldéhyde en C-ter. Le groupement thiazozylméthyle pourrait donc diminuer de manière significative la reconnaissance des composés par les deux enzymes. Plus précisément, le groupement électrophile pourrait empêcher les composés LJ4a et LJ5a de se positionner de manière optimale au niveau du site actif de la CASP-2. Toutefois, le composé LJ4a peut présenter un avantage lors des études sur les modèles cellulaires. Dans le modèle d'apoptose que nous utilisons au laboratoire, les composés sont souvent utilisés à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Par conséquent, pour les inhibiteurs Ac-VDVAD-CHO, DEVD-CHO et h33 et q33 qui sont efficaces de l'ordre du nanomolaire sur les CASP-2 et -3, cela pourrait poser un problème puisqu'aux concentrations de travail, l'activité CASP-3 est aussi inhibée. Avec un composé tel que le LJ4a,

nous pouvons utiliser des doses de 30 µM sans avoir à craindre d'effet sur la CASP-3, notamment dans des modèles d'apoptose où les taux en CASP-3 sont rapidement très élevés. Pour ces composés, nous perdons l'efficacité au nanomolaire et la sélectivité mais nous gagnons des composés qui peuvent être utilisés dans des modèles cellulaires d'apoptose, par exemple. En revanche, le composé LJ5a ne présente pas d'atout par rapport aux composés précédents.

B. LJ2a et LJ3a

Le premier composé LJ2, équivalent irréversible du q33, est un mélange de diastéréoisomères en P2. Malgré cela, le composé montrait un profil d'inhibition très intéressant puisque l'on conservait l'efficacité du ∆2Me-TRP601 avec une efficacité envers la CASP-2 de 1,2.10⁶ M⁻¹.s⁻ ¹ tout en ayant un effet préférentiel sur la CASP-2, avec un index de sélectivité de 22. Avec la synthèse des composés LJ2a et 2b, nous avons là aussi montré un différentiel considérable entre les stéréoisomères a et b. Après étude du mécanisme, nous avons démontré que le composé LJ2a est un inhibiteur extrêmement efficace de la CASP-2 avec un rapport kinact/Ki de 5,5.10⁶ M⁻¹.s⁻¹. Une telle efficacité inhibitrice a déjà pu être mise en évidence pour des peptides acyloxyméthyl-cétones sur la Cathepsine L notamment, où un composé présente une efficacité de 10,7.10⁶ sur cette enzyme (Brömmer D. et al., 1994). Pour cet inhibiteur, la puissance de l'inhibition est au détriment de la sélectivité. En effet, l'index de sélectivité en faveur de la CASP-2 est de 48, ce qui représente toutefois une efficacité deux fois plus élevée que le composé LJ2 initial. Enfin, avec le composé LJ3a, qui est l'équivalent irréversible du composé h33, on conserve l'efficacité du ∆2Me-TRP601 avec un efficacité envers la CASP-2 de 1,7.10⁶ M⁻¹.s⁻¹. Nous observons surtout un effet préférentiel envers la CASP-2 qui se traduit par un index de sélectivité de 950en faveur de celle-ci. Dans une revue publiée en 2013, Marin Poreba et ses collègues affirment qu'un « inhibiteur idéal » était puissant, avec une forte affinité et un index de sélectivité supérieur à 1.000. Ce composé doit bien-sûr aussi être biodisponible et être pharmacologiquement actif in vivo. Pour ces derniers points, des évaluations doivent être menées mais pour la première partie, le composé LJ3a rempli les conditions avec une affinité pour sa cible de $(2,8 \pm 0,8)$ nM et un index de sélectivité vis-à-vis de sa plus grande concurrente de 950.

Pour cette nouvelle série de molécules, nous avons étudié la sélectivité *vis-à-vis* des Cathepsines B, L et D ainsi que sur des enzymes concurrentes dans le système nerveux central.

À 10 μ M, les composés Ll2a et Ll5a ont montré un effet croisé sur la CASP-6. En effet, le composé Ll2a inhibe la CASP-6 avec une efficacité de 14,2 M⁻¹.s⁻¹, ce qui ne présente pas un inconvénient majeur compte tenu de la puissance de l'inhibition sur la CASP-2. Enfin le composé Ll5a agit sur la CASP-6 avec un Ki de 4,8 μ M. Ici, cet effet croisé ne nous préoccupe pas puisque le composé ne constitue pas un inhibiteur intéressant de la CASP-2.

Pour cette série, la conception rationnelle s'est révélée être une approche extrêmement fructueuse. Ce type de méthodologie pour le design d'inhibiteurs est un concept relativement ancien (Broom A.D. 1988) et s'est révélé également très efficace pour la conception d'inhibiteurs peptidiques de la protéase du VIH (Roberts N.A *et al.*, 1990). La caractérisation de ces molécules et notamment du composé LJ3a ouvre le champ des possibles sur les applications de cette molécule autant sur le plan de la pharmacologie, avec le développement de sonde d'activité spécifique, que sur le plan thérapeutique. Sur le plan thérapeutique, le concept de complémentarité stéréochimique entre le site actif d'une enzyme et son substrat a été introduit dès la fin du 19^{ème} siècle. Sur cette base, l'idée que des molécules mimes de substrat puissent constituer de bons inhibiteurs compétitifs n'était pas étonnante. D'ailleurs, les inhibiteurs de l'état de transition ou d'états intermédiaires sont connus pour se lier à leur cible avec une grande affinité et une bonne spécificité, ce type d'inhibiteurs est d'ailleurs prédominant en clinique. Tel est le cas pour les inhibiteurs Ritonavir, Indinavir et Saquinavir de la protéase du VIH, utilisés en traitement pour le SIDA. (Robertson J.G. 2005 ; Copeland R.A. *et al.*, 2007).

Pour l'aspect Recherche, cette molécule pourrait constituer un réel atout pour la détection de l'activité de la CASP-2. En effet, le manque de sondes spécifiques d'activité à souvent constitué un barrage à la compréhension des mécanismes d'actions de cette enzyme dans divers processus. Dans cette optique, au cours de la thèse, nous avons également fait synthétiser un analogue AMC du composé LI3a. Nous devons cependant encore poursuivre cette étude car nous ne sommes pas parvenus à détecter d'activité CASP-2 avec ce substrat dans nos conditions expérimentales.

VI.Modèle cellulaire d'apoptose

Les études du groupe Ho L. *et al.,* en 2008 avaient mis en évidence que la CASP-2 pouvait être impliquée dans l'apoptose initiée par une déstabilisation du cytosquelette, notamment induite par la Vincristine, un alcaloïde qui se fixe à la tubuline et empêche la polymérisation

des microtubules. Ces observations corroborent d'ailleurs avec le fait que les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique présentent de faibles taux de CASP-2 et que leurs cellules soient résistantes à l'apoptose suite au traitement par la Vincristine. Sur la base de ces données et avant que je n'entreprenne ma thèse, Etienne Jacotot et Julie Anastasie ont mis au point un modèle de mort cellulaire où l'apoptose est induite dans des cellules HeLa par un traitement de 24h à 48h avec 20 nM de Vincristine. Dans ce modèle, l'ensemble des inhibiteurs peptidiques jusqu'au premier LJ2 ont été testés. Nous avons alors montré que les inhibiteurs généraux de Caspases, z-VAD(OMe)-fmk, Emricasan et Q-VD-OPh protégeaient efficacement les cellules de la mort induite par la vincristine et ce, de manière dosedépendante. À 30 µM les composés Q-VD-OPh et surtout Emricasan permettent de protéger les cellules HeLa de la mort à environ 90 %. Compte tenu de l'effet de l'inhibiteur pan-Caspase Q-VD-OPh, ce modèle de mort est dépendant des Caspases. Toutefois, ces effets laissent à penser que la voie de mort engagée dans ce modèle ne soit pas strictement CASP-2 dépendante. En effet, le composé Q-VD-OPh a un effet inactivateur modéré sur l'activité CASP-2 dans les tests enzymatiques in vitro, d'une part, et le composé Emricasan un puissant inhibiteur des CASP-8 et -9, démontre une forte efficacité à prévenir de la mort dans ce modèle, d'autre part. Par conséquent, nous pouvons supposer que l'apoptose induite dans ce modèle pourrait faire intervenir les CASP-8 ou -9.

Dans d'autres modèles cellulaires il est connu que la vincristine induit une apoptose CASP-9 dépendante. Par exemple, il a été montré que dans lignées de neuroblastomes SH-SY5Y, la vincristine conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase M, en entraînant la surexpression de la Cycline B, qui favorise la transition G2-M2, tout en diminuant l'expression de la Cycline D qui joue un rôle dans la transition G1-S. Mais la Vincristine est aussi capable d'induire l'apoptose en impliquant les CASP-3 et-9 (Tu Y. *et al.*, 2013). Dans les cellules Jurkats, la vincristine à 10 μ M induit un arrêt en phase G2-M après 10 h de traitement. Au-delà de 10h de traitement avec l'inducteur, une élévation de l'apoptose CASP-9 dépendante est détectée (Groninger E. *et al.*, 2002).

En plus de ces observations, nous avons également pu montrer que les composés TRP601 et son métabolite déméthylé, ainsi que le composé LJ2, permettaient de prévenir de manière dose dépendante de la mort cellulaire induite par la vincristine. Cependant, l'effet cytoprotecteur de ces molécules à 60 μ M est 3 fois moins puissant que l'effet du Q-VD-OPh à 30 μ M. Là encore, ces résultats suggèrent qu'une autre voie de mort Caspase-dépendante

puisse être mise en jeu. Les études des différents inhibiteurs sur l'activité CASP-8 et -9 permettraient de lever le doute sur ce modèle. Malheureusement, au cours de la thèse nous n'avons pas réussi à optimiser les conditions expérimentales optimales nécessaires à l'étude de l'activité enzymatique de la CASP-8.

Dans ce modèle, nous avons également évalué l'effet cytoprotecteur des inhibiteurs h33 et q33. Aucun effet dose réponse n'a été observé et leur efficacité à protéger de la mort cellulaire est plutôt modérée. L'efficacité moyenne de ces composés dans ce modèle s'explique par la nature de l'inhibiteur. Il faut d'une part mentionner les paramètres de biodisponibilité du peptide. En effet, ces composés peuvent rapidement être soumis à une dégradation par des protéases bien que leur extrémité Cter soit protégée. D'autre part, il est important de prendre en compte la perméabilité membranaire des peptides. En effet, si le problème ne se pose pas pour les inhibiteurs irréversibles, notamment pour les Q-VD-OPh et les molécules de la série TRP. Ces composés possèdent un groupement carboxy-quinoline qui favorise leur passage des membranes contrairement aux composés h33 et q33 qui n'ont sans doute pas une telle propriété. D'autre part, dans le modèle HeLa-Vincristine la cinétique est longue, au moins 24h, et compte tenu de la nature réversible de l'inhibition, il est possible que l'effet au bout d'un tel délai se soit dissipé. Pour les inhibiteurs irréversibles, le problème ne se pose pas puisqu'ils inactivent de manière définitive la cible. Ainsi, leur durée d'action dépend exclusivement du turn-over de l'enzyme dans ce modèle. De ce fait, nous pouvons constater que la hiérarchie des effets de protection vis-à-vis de l'apoptose dans notre modèle est compatible avec les mécanismes d'inhibition caractérisés dans nos tests enzymatiques. Ce modèle, bien qu'imparfait, constitue un modèle initial d'intérêt pour une évaluation des effets cellulaires des inhibiteurs de CASP-2.

VII. La Caspase-2 et son implication potentielle dans la maladie d'Alzheimer

A. La Caspase-2 prévient de la perte synaptique induite par les oligomères Aβ₁₋₄₂

Pour cette étude de l'implication potentielle de la CASP-2 dans la maladie d'Alzheimer, nous avons choisi d'étudier un rôle non apoptotique de cette dernière afin de prévenir de l'activation massive de la CASP-3. Nous nous sommes donc intéressés à son rôle en tant que

médiateur de la synaptoxicité du peptide β -amyloïde en se plaçant à des doses sub-toxiques de ce dernier.

Reconstruire un réseau de neurones mature, fonctionnel et orienté dans lequel chaque population cellulaire peut être traitée indépendamment constitue un réel atout pour combler le fossé qui sépare actuellement les études in vivo et in vitro. Les niveaux d'intégration diffèrent en effet entre les deux approches. Les études vivo demeurent optimales pour ce qui concerne l'architecture neuronale. Toutefois, les manipulations cellulaires et moléculaires dans ces modèles de pathologies sont très souvent limitées. D'un autre côté pour les études in vitro, les évaluations cellulaires et moléculaires sont très aisées mais le déficit de connexions avec les conditions in vivo rend souvent l'interprétation des résultats complexe. Dans ce contexte, les dispositifs microfluidiques développés par Jean-Louis Viovy, Jean-Michel Peyrin et Bernard Brugg (Peyrin et al., 2011) proposent une alternative pour réconcilier les modèles in vitro et in vivo. Il est en effet possible, dans de tels dispositifs, de reconstruire des réseaux fonctionnels de neurones et ce, sur des populations différentes de neurones. Sur ces réseaux, des traitements pharmacologiques peuvent être appliqués sur des compartiments isolés fluidiquement, ce qui permet de traiter différemment les diverses populations de neurones (Peyrin J.M. et al., 2011). Enfin, notre laboratoire ayant été pionnier dans le développement de cette technologie, nous avions accès aux moules de recherche puis aux moules industriels développés par la spin-off du laboratoire (MicroBrain BT[®]). À partir de ces moules et des protocoles développés au laboratoire (détaillés en partie « Matériels et Méthodes »), les dispositifs en PDMS sont facilement produits.

Ainsi, les cultures de neurones ou de circuits de neurones dans des dispositifs microfluidiques constituent d'excellents outils pour l'étude du rôle de la CASP-2 au niveau de la synapse. Plus précisément, la reconstruction de réseaux cortex-hippocampe dans des diodes microfluidiques permet de modéliser la première étape de la voie perforante, connue pour être atteinte précocement dans la maladie d'Alzheimer (Deleglise B. *et al.*, 2014). Sur les réseaux fonctionnels de neurones Cortex/Hippocampe nous avons démontré que le traitement du compartiment somato-dendritique des neurones corticaux avec des oligomères A β_{1-42} à 10 nM induit une perte synaptique dans le compartiment Hippocampique en 6 heures. Puisque ce compartiment n'est pas directement exposé aux oligomères, cela signifie que l'application locale d'A β_{1-42} au niveau des corps cellulaires des neurones corticaux entraîne une synaptotoxicité rapide avant qu'une dégénérescence axonale ou somatique n'ait été mise

en évidence. Ce dernier point est confirmé par la conservation de l'intégrité des structures somatiques et axonales des neurones corticaux (marquages β_{III} -tubuline et Hoescht respectivement). D'après l'étude réalisée par Deleglise B. *et al., en* 2014, cet effet des oligomères A β_{I-42} pourrait avoir plusieurs origines. En effet, la synaptotoxicité pourrait être la cause d'une propagation directe des oligomères au travers du neurone, ou une distribution rapide du peptide amyloïde *via* un transport axonal. Il est également intéressant de mentionner que les oligomères pourrait être alors relayé à travers tout le neurone, avec pour conséquence, la perte synaptique.

Dans les cultures de neurones de l'hippocampe seuls, nous avons validé le fait que la perte synaptique était la conséquence de l'état oligomérique du peptide amyloïde puisque sous sa forme non oligomérisée, le peptide $A\beta_{1-42}$ n'entraîne pas de perte synaptique.

Dans les réseaux de neurones, nous avons démontré que le composé LJ2 initial à 30 μ M était capable de protéger de manière significative le compartiment hippocampique de la perte synaptique induite suite au traitement avec des oligomères A β_{1-42} dans la chambre somatodendritique corticale. Les nouveaux composés de la série « LJ » doivent encore être validés dans ce dispositif.

Sur des cultures de neurones de l'hippocampe seul, nous avons montré que les nouveaux composés LJ3a et LJ2a avaient un effet synaptoprotecteur sur des neurones de l'hippocampe traités avec des oligomères A β_{1-42} . De plus, ces effets sont observés à des doses 300 fois plus faibles que le composé LJ2 initial. Toutefois, nous n'avons pas pu définir de dose réponse pour les nouveaux composés LJ2a et LJ3a, il est donc nécessaire de poursuivre l'étude pour compléter ces premiers résultats. Dans leur étude menée sur le rôle de la CASP-2 vis-à-vis de la modulation de la plasticité synaptique en réponse à A β , Pozueta J. *et al.*, en 2013 ont proposé que la CASP-2 pourrait contrôler la localisation, et peut être la signalisation RhoA/ROCK II, pour participer à la modulation des changements synaptiques et à l'altération de la mémoire induits par A β . Nous pouvons donc supposer que la présence de nos inhibiteurs prévient de la délocalisation de la CASP-2 au niveau de la synapse, empêchant ainsi l'activation de la voie RhoA/ROCK II qui entraîne classiquement la perte synaptique. De nombreuses études complémentaires sont à réaliser avant de valider cette hypothèse.

Les résultats que nous avons ainsi obtenus constituent une base pour la compréhension du rôle de la CASP-2 au niveau de la synapse dans des conditions de stress Aβ.

Des contrôles avec des inhibiteurs non spécifiques sont encore à réaliser pour valider l'efficacité de nos composés sélectifs. Ces résultats seront également à confronter avec des données supplémentaires sur des souris CASP-2^{flox/flox}.

B. Caspase-2 et clivage de Tau

Comme évoqué en introduction et dans la partie « Résultats », une connexion entre la protéine Tau et la CASP-2 a été mis en évidence dans une étude récente (Zhao X et al., 2016). Au cours de cette thèse, nous avons donc entrepris d'évaluer le clivage de Tau par la CASP-2 au travers de deux approches. D'une part, nous avons étudié l'effet inhibiteur du composé YKPVD-CHO sur l'activité CASP-2 et d'autre part, nous avons étudié les effets sur le clivage protéolytique de la protéine Tau par la CASP-2. La séquence du peptide aldéhyde Ac-YKPVD-CHO contient le motif reconnu par la CASP-2 sur la séquence de Tau. Un brevet avait été déposé sur ce peptide aldéhyde par Karen Ashe et coll. (Réf : US20140171373A1), et les coinventeurs avaient rapporté que la CASP-2 était inhibée par ce peptide avec un Ki de 200 nM contre un effet à 19,3 µM sur la CASP-3. Nous avons donc réévalué dans nos conditions les effets inhibiteurs de ce peptide, sans succès, puisque de 100 nM à 100 μ M, aucun pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la CASP-2 recombinante n'a été mis en évidence. De manière encore plus surprenante, seul un inhibiteur sur la CASP-3 a pu être déterminé avec une IC₅₀ estimée à (60,4 \pm 3,4) μ M. Après analyse du brevet, nous avons constaté que les auteurs utilisaient un dispositif de détection couplé avec de la luminescence par opposition à notre test *in vitro* pour la mesure cinétique directe de nos activités par spectrofluorométrie. Ces différences dans les techniques de détection et de paramètres évalués peuvent en partie expliquer que nous ne soyons pas parvenus à retrouver l'effet inhibiteur. Toutefois, si nous basons notre réflexion sur la séquence peptidique de ce supposé inhibiteur, il était étonnant de concevoir que la CASP-2 puisse être inhibée par un tel motif. En effet, dans le sous-site S5 de la CASP-2 formé par les chaîne latérales d'une Tyrosine et d'une Proline, un résidu Valine est généralement accommodé. Il est donc étonnant de trouver une Tyrosine à cette position dans le pentapeptide inhibiteur. Un résidu basique en position P4 telle qu'une Lysine est aussi surprenant puisque le sous-site S4 montre généralement une forte spécificité envers la fixation les résidus Aspartate. Au niveau du résidu en position P3, le remplacement de

l'Alanine par un résidu encombrant comme la Proline est aussi surprenant (R.V Talanian et al., N. Thornberry et al., 1997 ; Maillard M.C. et al., 2011). Tous ces éléments convergent vers le fait que la CASP-2 ne pouvaient pas être efficacement inhibée par ce type de motif.

Nous avons aussi étudié les produits de clivage de Tau-441 par les CASP-2 CASP-3 in vitro par SDS-PAGE. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu mettre en évidence la libération du fragment de 35 kDa, normalement issus du clivage de Tau par la CASP-2. De plus, le profil de migration obtenu pour la protéine seule sur le gel Coomassie est différent de celui que les auteurs ont obtenu dans leur étude. En effet, nous observons un fragment d'une taille supérieure à 50 kDa tandis qu'ils obtiennent un fragment de masse moléculaire apparente à 50 kDa. Les différences dans les sources et dans l'état de fibrillation des protéines Tau utilisées peuvent expliquer cette divergence des résultats. En effet, dans leurs études, Zhao X et al., 2016, ont utilisé une protéine Tau humaine, purifiée à partir de lysats de cerveaux de souris rTg4510. En revanche, dans les expériences que nous avons réalisées, nous avons utilisé une protéine Tau humaine recombinante, produite chez E.Coli, reconstituée dans de l'eau à partir d'un lyophilisat. Nous n'avons donc aucun contrôle sur l'organisation structurale de la protéine. Ces différences pourraient donc expliquer que nous n'ayons pas la même protéine en termes d'organisation et de longueur (en acides aminés), expliquant ainsi les profils migratoires distincts pour la protéine Tau seule. Cette différence dans la source peut alors expliquer que l'on ne soit pas capable de reproduire le clivage au niveau de l'Asp-314. Cette supposition amène à une interrogation sur la capacité de la CASP-2 à cliver seulement un certain type de forme de la protéine Tau.

Il est également à noter que leur technique de révélation est plus sensible que la nôtre puisqu'ils étudient les produits de clivage par Western Blot.

Toutefois, la coloration au bleu de Coomassie nous a permis d'observer un fragment de plus faible poids moléculaire, en dessous du fragment attendu pour Tau. Nous avons également mis en évidence que dans ces conditions, nous reproduisions le clivage de Tau par la CASP-3. Pour ce dernier point, nous pouvons supposer que nous parvenons à reproduire le clivage de Tau au niveau de l'Asp-421 par la CASP-3 (Gamblin T.C. *et al.,* 2003). Nous pourrions supposer au vu des résultats que la CASP-2 est également capable de cliver Tau au niveau de l'Asp-421 bien que cela n'ait jamais été démontré. Une analyse complémentaire par Western Blot ou spectrométrie de masse permettrait d'identifier avec exactitude la nature des fragments générés.

Il existerait un lien entre l'accumulation de plaques amyloïdes à l'extérieur des neurones et la formation des enchevêtrements des neurofibrilles de Tau dans les neurones. En effet, des études ont démontré que des neurones déficients en Tau sont résistants à la neurotoxicité induite par le peptide amyloïde (Rapoport M. *et al.*, 2002). De plus, les Caspases, en clivant Tau au niveau de l'Asp-421, entraînent la formation de fibrilles (Gamblin T.C. *et al.*, 2003). Plus précisément, en clivant au niveau de la région C-ter, qui est en condition physiologique repliée sur une région de liaison aux microtubules, les Caspases favorisent la polymérisation de ce domaine. Afin d'établir un lien entre ces deux facteurs majeurs de la maladie d'Alzheimer, des études ont été réalisées au laboratoire pour étudier la localisation de la CASP-2 en condition de stress Aβ, malheureusement aucun résultat probant n'a pu être obtenu.

C. Inflammation et maladie d'Alzheimer, un rôle pour la Caspase-2 ? Nous nous sommes proposés d'étudier l'effet du premier LJ2 dans un modèle inflammatoire que nous avons mis en place au laboratoire. Ainsi sur des lignées THP-1, nous avons montré que l'ajout de 25 μ M de VX-765 permettait de réduire considérablement la libération extracellulaire d'IL-1 β induite par un traitement avec du LPS et de la nigéricine dans le milieu. Nous avons donc supposé que nous avions un modèle inflammatoire CASP-1 dépendant. Dans ce modèle, des premiers résultats ont montré que l'ajout de 25 μ M du premier LJ2 permettait de prévenir du relargage de la cytokine dans le milieu et ce, en absence de mort cellulaire. À ce stade, nous ne pouvons pas tirer de conclusions et des études complémentaires de doses réponses avec ce composé ainsi qu'avec le nouveau composé LJ3a sélectif sont à réaliser pour conclure quant à un rôle de la CASP-2 dans ce processus.

L'accumulation de peptide Aβ initie une réponse immunitaire en activant la microglie. À la surface de ces cellules, des récepteurs sont activés par l'Aβ. Ce processus entraîne une réponse neuro-inflammatoire qui a pour conséquence directe le relargage de médiateurs inflammatoires et d'un ensemble de composés neurotoxiques. Dans la maladie d'Alzheimer, cette réponse inflammatoire est initiée par l'activation des récepteurs PRRs (Pattern recognition receptors) qui reconnaissent des PAMPs ou des DAMPs. Ces récepteurs peuvent être présents à la membrane (TLR) ou dans le cytoplasme (NLR) des cellules gliales, des macrophages ou des oligodendrocytes. Dans la cellule, l'activation de ces récepteurs conduit à la formation des inflammasomes, qui entraînent l'activation de la CASP-1 et

l'activation/maturation des IL-1β, IL-18 et IL-33. Il a été montré que l'Aβ peut activer l'inflammasome NLRP3 dans la microglie et que cette activation est requise pour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que pour la propagation du signal inflammatoire (Halle A. *et al.*, 2008 ; Tan M.S. *et al.*, 2013). De plus, l'activation de NLRP3 semble jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer en maintenant une inflammation chronique. D'ailleurs, l'inhibition de NLRP3 dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer protège de la perte de la mémoire spatiale et diminue les dépôts de plaques amyloïdes (Heneka M.T. *et al.*, 2013). En parallèle de cela, un stress du RE induit par une infection avec RB51 entraîne une activation de l'inflammasome par un mécanisme impliquant l'activation de CASP-2 par NLRP3. Plus précisément, NLRP3 pourrait faciliter le relargage du contenu mitochondrial ainsi que l'activation de l'inflammasome *via* l'activation de CASP-2 dans ce contexte (Bronner D.N. *et al.*, 2015). Un lien est donc établi entre NLRP3 et la CASP-2 dans ces conditions de stress du RE. Nous pouvons donc supposer que ce lien pourrait être étendu au contexte neuroinflammatoire dans la maladie d'Alzheimer.

VIII. Autres stratégies pour l'obtention d'inhibiteurs de Caspase-2

En complément à la stratégie de ciblage du site actif par les peptides, nous avons exploré d'autres pistes afin de découvrir de nouveaux *scaffolds* chimiques pour inhiber la CASP-2. Nous avons donc employé une stratégie visant à concevoir rationnellement des peptides de l'interface de dimérisation en collaboration avec l'équipe « Biolnformatique et Biophysique » de Jacques Chomilier et Dirk Stratmann de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC, Sorbonne université). Malheureusement, le pentapeptide cyclique obtenu par approche *in silico* n'a démontré aucun pouvoir inhibiteur *vis-à-vis* de la CASP-2. Par manque de temps, nous n'avons pas pu concevoir d'autres peptides optimisés mais les analyses de modélisation moléculaire ont mis en évidence une dynamique du pont disulfure à l'interface de dimérisation de la CASP-2. Des analyses de dynamique moléculaire pourraient être poursuivies dans ce sens pour comprendre le fonctionnement de ce pont disulfure. Aussi, ces analyses ont permis de mettre en évidence que ce pont disulfure était entouré d'un réseau de molécules d'eau peu dynamique. Ce réseau de molécules d'eau pourrait également être ciblé pour conduire à une perte de l'activité enzymatique (Bertoldo J.B. *et al.*, 2017). Pour ces deux approches, le but n'est pas de déstabiliser le dimère mais

plutôt d'induire un effet à distance sur le site actif afin d'agir sur l'affinité Enzyme-Substrat en induisant une forme fermée du site actif. Par conséquent, si l'approche ne s'est pas révélée fructueuse dans l'obtention de composé inhibiteur, les résultats constituent une base solide qui pourra être exploitée par la suite.

Enfin, la stratégie de criblage rationnel basé sur les *scaffolds* chimiques de la littérature et le criblage aléatoire de petites banques de molécules organiques disponibles au laboratoire (123 composés testés) n'a pas permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs organiques de la CASP-2. Il est vrai que l'approche « petites molécules organique » présente de nombreux avantages, notamment pour le développement clinique (Rotella D.P. *et al.*, 2016), mais pour l'inhibition efficace et sélective de la CASP-2 nos résultats attestent que les peptides inhibiteurs s'avèrent être une meilleure stratégie. D'ailleurs, la présence des inhibiteurs peptidiques de Caspases en essais cliniques nous conforte dans cette stratégie (MacKenzie S.H. *et al.*, 2010 ; Kudelova J. *et al.*, 2015).

IX.Positionnement des composés LJ2a et LJ3a pour un développement clinique.

Les enzymes représentent environ 30 % des cibles médicamenteuses. La stratégie communément employée pour le développement d'inhibiteurs à visée thérapeutique est focalisée en partie sur la conception de molécules de faible poids moléculaire qui se lient à leur cible de manière non covalente. L'optimisation de ces molécules pour améliorer les paramètres de sélectivité et d'efficacité passe par des fonctionnalisations de la molécule pour favoriser la complémentarité de surface et améliorer les interactions non-covalentes (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, ponts salins) avec l'enzyme cible (Lagoutte R. et al., 2017). Pendant de longues années les inhibiteurs covalents ont été mis de côté par les industriels de par les réactions croisées avec d'autres cibles et la toxicité de ces composés in vivo. Pourtant, deux inhibiteurs covalents largement connus et utilisés sont l'aspirine et la pénicilline. Le premier est un inhibiteur irréversible de la cyclooxygénase et agit par une acétylation de la sérine catalytique. La pénicilline se lie de manière covalente à la Sérine du site actif d'une transpeptidase impliquée dans la formation du peptidoglycane bactérien. Mais depuis quelques années ces inhibiteurs connaissent un regain d'intérêt, avec une présence d'environ 30 % sur le marché du médicament, quelques-uns de ces composés sont présentés ci-dessous. (De Cesco S. et al., 2017).

Aujourd'hui, l'idée que des médicaments covalents puissent être utilisés redevient acceptable, puisque 30 % des médicaments sur le marché agissent par un mécanisme covalent (Mah R. *et al.*, 2013 ; Bauer R.A. et al., 2015). Bien que les risques liés aux inhibiteurs covalents soient connus, la durée prolongée de leur l'inhibition présente bien des avantages. Ces derniers incluent : i) une meilleure efficacité avec une compétition avec les substrats endogènes réduite, ii) un dosage réduit et une administration plus espacée qui allègent les charges du patient, iii) une dissociation des paramètres de pharmacocinétique et pharmacodynamique, puisque cette dernière est dépendante du renouvellement de l'enzyme cible, iv) prévention de la résistance au traitement (Singh J. *et al.*, 2011 ; Baillie T.A. *et al.*, 2016). Les dernières décennies sont une nouvelle ère pour le développement des inhibiteurs covalents avec l'approbation d'un certain nombre d'inhibiteur de ce type par la FDA : l'inhibiteur du protéasome 20S ; le Carfilzomib[®] dans le traitement du myélome multiple ; le telaprevir, inhibiteur de la prostéase de l'hépatite C ; l'abiraterone[®], un inhibiteur du cytochrome P17A1 pour le cancer de la prostate métastatique ; ou encore l'afatinib[®] un inhibiteur de l'EGFR dans le traitement du cancer du poumon (Mah R. *et al.*, 2013).

Cependant, les agents covalents irréversibles constituent toujours un risque pour le développement de médicaments. En effet, deux incidents graves sont survenus et ont conduit aux décès de patients qui avaient été traités avec des TCI irréversibles. Le premier composé est le Beloranib, un inhibiteur de la méthionine aminopeptidase 2 recommandé comme agent anti-obésité. Le second composé, BIA 10-2474, est un inhibiteur de l'hydrolase des amides d'acides gras prescrit en Phase I pour des douleurs neuropathiques (affection du système sensoriel). Il n'y a pas de preuves quant à l'implication du mécanisme d'action de ces composés, toutefois des précautions sont à prendre pour le développement de telles molécules : optimiser la molécule pour qu'elle soit la plus sélective possible, utiliser de faibles doses et minimiser la réactivité des groupements électrophiles de manière à éviter la formation de métabolites secondaires toxiques (Lonsdale R. *et al.*, 2018).

Comme pour les inhibiteurs covalents, les peptides connaissent aussi un nouvel essor. Au début du 20^{ème} siècle ils ont connu un réel succès, notamment avec la découverte et le développement de l'insuline, qui a été introduite en 1982 comme première protéine recombinante en tant que médicament. Cependant, malgré tout cet engouement autour de ces molécules, les peptides en tant que médicaments ont rapidement été mis de côté à la fin du 20^{ème} siècle à cause de limitations inhérentes à la structure des composés : faible demi-vie

et faible biodisponibilité orale. Ce dernier point est un obstacle au confort du patient. En effet, l'injection que nécessite les peptides est une option beaucoup moins attrayante pour les pathologies nécessitant un traitement chronique. Par conséquent, leurs propriétés intrinsèques définissent leurs forces et leurs faiblesses en tant que molécules thérapeutiques. Néanmoins, les deux dernières décennies ont vu renaître les peptides en tant que médicaments. En effet, depuis 2000, 28 nouveaux médicaments peptidiques non insuliniques ont été approuvés dans le monde et plusieurs d'entre eux ont connu un succès commercial (Lau J.L. *et al.*, 2018 ; Henninot *et al.*, 2018). Finalement, nos inhibiteurs, qui combinent les propriétés de deux « bêtes noires » des molécules en clinique, se placent dans un contexte très favorable à leur développement.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les Caspases, pour CysteinylAspartate-SpecificProtease, sont des endoprotéases à Cystéine utilisant une dyade catalytique Cystéine-Histidine. L'histidine permet l'activation du thiolate de la cystéine pour initier l'hydrolyse de substrats peptidiques après un résidu Aspartate. Les Caspases sont largement connues pour leurs rôles majeurs dans l'initiation et l'exécution de la mort cellulaire programmée par apoptose, ainsi que dans la régulation de l'inflammation. En plus de ces rôles elles sont également impliquées dans d'autres processus physiologiques majeurs tels que la différenciation cellulaire, la réparation tissulaire et la prolifération. Elles ont aussi un rôle clé dans le cerveau en développement et adulte, notamment les CASP-3, -8 et -9. Compte tenu de la polyvalence de leurs fonctions, une dérégulation de l'expression ou de l'activité de ces dernières se retrouve au cœur d'un grand nombre de pathologies, particulièrement dans les pathologies neurodégénératives. Dans ce contexte elles se positionnent en cibles thérapeutiques de choix pour ces pathologies qui ciblent le système nerveux central.

Parmi les Caspases, la CASP-2 (NEDD-2, ICH-1) a été le deuxième membre de cette famille à être identifié. En 1994, elle était, chez la souris, l'enzyme dont l'expression de l'ARNm était *up*-régulée dans le cerveau en développement et *down*-régulée dans le cerveau adulte. Le cerveau en développement étant le siège d'un processus accru de mort cellulaire, un rôle dans l'apoptose lui a rapidement été attribué. Cependant, puisque les souris constitutivement déficientes en CASP-2 ne présentaient pas de phénotypes majeurs, ses rôles dans l'apoptose et dans d'autres processus physiologiques ont longtemps été considérés comme redondants. Aujourd'hui, il est clair qu'elle agit en initiatrice de l'apoptose suite à divers stress cellulaires comme la déstabilisation du cytosquelette, chocs thermiques, dommages à l'ADN, agents pathogènes, *etc*. En plus de ses fonctions apoptotiques, elle est également impliquée dans de nombreux processus non apoptotiques tels que la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme des lipides, la régulation du stress oxydant, la répression de l'autophagie.

Des études récentes ont contribué à la validation de la CASP-2 en tant que cible thérapeutique potentielle de la maladie d'Alzheimer. Les deux caractéristiques majeures de cette maladie sont le dépôt de plaques amyloïdes, conséquences d'une agrégation du peptide β -amyloïde (A β) entre les neurones, et l'enchevêtrement de neurofibrilles, causés par l'hyperphosphorylation et la dégradation de la protéine Tau dans les neurones. Dans ce

contexte, la CASP-2 agit comme médiateur de la neurotoxicité et synaptotoxicité du peptide amyloïde mais elle est également impliquée dans les déficits cognitifs causés par une délocalisation anormale de la protéine Tau au niveau de la synapse.

Il est donc nécessaire de disposer d'outils pharmacologiques spécifiques qui permettraient d'étudier les fonctions de la CASP-2 dans les neurones et plus particulièrement au niveau de la synapse, en conditions physiologiques et pathologiques. Le développement de tels outils passe par la conception de molécules qui agissent efficacement et sélectivement sur la CASP-2. Les peptides mimes de substrats qui ciblent le site actif constituent un réel atout pour le développement d'inhibiteurs. Cependant, la conservation des sites actifs entre Caspases et notamment entre CASP-2 et -3, qui partagent les mêmes spécificités de substrats, impacte considérablement la sélectivité des peptides inhibiteurs envers la CASP-2. De plus, compte tenu des rôles majeurs de la CASP-3 dans le système nerveux central, il est important de ne pas inhiber son activité. Les inhibiteurs de Caspases sont généralement construits en trois modules, une extrémité N-ter, suivi d'une séquence penta ou tétrapeptidique basée sur un motif préférentiellement reconnu par la Caspase cible, associé à un groupement électrophile en C-ter. Par conséquent, le motif préférentiellement reconnu par la CASP-2, VDVAD est aussi efficacement reconnu par la CASP-3. Le but de ces trois années de thèse a donc été de définir, de concevoir et de caractériser des inhibiteurs puissants de la CASP-2 avec des effets modérés sur la CASP-3. Pour cela, nous avons utilisé trois approches :

- Une approche dite rationnelle, basée sur la conception de peptides inhibiteurs du site actif
- Une approche *in silico*, pour développer des inhibiteurs de l'interface de dimérisation, en se basant sur la singularité de la CASP-2 à posséder un pont disulfure dans cette région
- Une approche de criblage aléatoire et rationnelle de petites molécules organiques, dont le but était d'enrichir l'arsenal d'inhibiteurs de Caspase.

Sur les trois stratégies utilisées au cours de la thèse, seule l'approche de conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques ciblant le site actif s'est avérée fructueuse. Bien que les deux autres méthodes et plus particulièrement, le ciblage de l'interface de dimérisation constitue une approche innovante pour la conception de nouveaux peptides inhibiteurs.

 Nous avons validé dans nos conditions expérimentales que le remplacement de l'alanine par un groupement organique encombrant dans le motif de référence VDVAD

permettait d'accroître la sélectivité en faveur de la CASP-2. Plus précisément, les composés q33 et h33 inhibent efficacement la CASP-2 de manière réversible avec des Ki au nanomolaire et avec des effets plus modérés sur la CASP-3. Cela se traduit par des index de sélectivité en faveur de la CASP-2 de respectivement 85 et 597.

- En combinant les motifs VDVXD des composés h33 et q33 avec l'extrémité C-ter thiazozylméthyle du Ritonavir, nous avons obtenus 4 composés réversibles LJ4a, LJ4b, LJ5a et LJ5b et en avons tiré les conclusions suivantes :
 - L'efficacité de l'inhibition est conditionnée par la stéréospécificité des composés.
 - LJ4a et LJ5a sont nettement moins puissants sur la CASP-2 que les composés initiaux q33 et h33.
 - L5a ne présente aucun bénéfice dans l'efficacité et la sélectivité par rapport au composé h33.
 - LJ4a bien que moins efficace et sélectif que q33, il présente un profil d'inhibition qui peut être intéressant dans des modèles cellulaires.
- En associant les propriétés structurales du motif VDVXD des composés h33 et q33, avec les extrémités amino et carboxy- terminales de l'inhibiteur irréversible Q-VDVAD-OPh (Δ2-Me-TRP601) efficace sur les CASP-2 et -3, et à un moindre degré sur la CASP-6, nous avons obtenu 5 inactivateurs des CASP-2 et -3 :
 - LJ2, est un mélange de diastéréoisomères en P2. *In vitro*, c'est un inactivateur efficace de la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 1,2.10⁶ M⁻¹.s⁻¹ associé à un pouvoir 22 fois moins fort sur la CASP-3.
 - L'efficacité de l'inhibition est conditionnée par la stéréospécificité des composés.
 - Le diastéréoisomère LJ2a est encore plus puissant sur la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 5,5.10⁶ M⁻¹.s⁻¹. De plus, il est 48 fois moins efficace sur la CASP-3.
 - Le diastéréoisomère LJ3a est aussi un inactivateur puissant de la CASP-2 avec un rapport k_{inact}/K_I de 1,7.10⁶ M⁻¹.s⁻¹; et surtout il est 950 fois moins efficace sur la CASP-3.
 - Aucun effet croisé significatif de ces molécules n'a été mis en évidence sur le panel de protéases concurrentes testé.

Nous avons également démontré que LJ2a et LJ3a à 0,1 μ M permettent de protéger de la perte synaptique induite par les oligomères A β_{1-42} sur des cultures de neurones primaires. Enfin, nous avons également montré un effet synaptoprotecteur du composé LJ2 dans des dispositifs microfluidiques qui permettent de modéliser la voie perforante, précocement atteinte dans la maladie d'Alzheimer. Plus précisément, sur des réseaux de neurones fonctionnels Cortex/Hippocampe, LJ2 appliqué sur le compartiment hippocampique à une dose de 30 μ M, permet de protéger de la perte synaptique induite par des oligomères A β_{1-42} dans le compartiment cortical somato-dendritique.

Compte tenu de ces résultats, nous pouvons dire que nous avons enrichi l'arsenal d'inhibiteurs de Caspases avec deux nouveaux puissants inactivateurs de la CASP-2. Ces molécules en plus d'être efficaces ont démontré un profil de sélectivité inédit envers cette enzyme. Enfin, ces inhibiteurs ont des activités limitées voire nulles sur un panel de protéases concurrentes d'intérêt dans le système nerveux central.

Ces nouveaux inhibiteurs ouvrent le champ à de nombreuses perspectives, à la fois sur le plan de la valorisation et de la Recherche Fondamentale.

Ces inhibiteurs pourraient être la base de la conception de sondes d'activité qui permettraient d'étudier de manière fine les fonctions de la CASP-2 en condition physiologique ou pathologique, puisque jusqu'à présent de tels outils n'existent pas.

Sur la plan thérapeutique, ces composés aux propriétés neuroprotectrices s'insèrent dans un contexte où les inhibiteurs covalents et peptidiques connaissent un nouvel essor. Depuis quelques années, le nombre de molécules formant des liens covalents avec leurs cibles a considérablement augmenté dans les essais cliniques ou les approbations de la FDA (Lagoutte R. *et al.*, 2017). Par ailleurs, les deux dernières décennies ont vu renaître les peptides en tant que médicaments. En effet, depuis 2000, 28 nouveaux médicaments peptidiques non insuliniques ont été approuvés dans le monde et plusieurs d'entre eux ont connu un succès commercial. Ce succès a conduit les industriels à reconsidérer l'usage des peptides pour la découverte de nouveaux médicaments, dans un contexte où la découverte de nouveaux composés est nettement ralentie et très coûteuse malgré des progrès considérables de la technologies (HTS ou *high throughput screening*, chimie combinatoire, ...) (Henninot A. *et al.*, 2017).



Schéma bilan des principaux résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse.

Par une approche de conception rationnelle les propriétés structurales du motif VDVXD des composés h33 et q33 ont été associés aux extrémités amino-et carboxy-terminale du composé Q-VD-OPh. Ce *design* a conduit à la synthèse d'une première molécule non stéréospécifique, L12. Cette dernière est un puissant inactivateur de la CASP-2 mais est également bien reconnu par la CASP-3. Dans des modèles *in vitro* mimant la voie perforante, nous avons montré que le composé à 30 µM permet de prévenir, au niveau des neurones de l'hippocampe, de la perte synaptique induite par les oligomères A β_{1-42} sur les corps cellulaires des neurones corticaux. Nous avons également montré qu'à cette même dose, la molécule protégeait de la perte synaptique sur des cultures de neurones de l'hippocampe. La difficulté à obtenir les synthons organiques stéréospécifiques a retardé la synthèse des composés L12a et L13a. Après obtention des molécules, nous avons enfin pu montrer qu'elles agissaient en puissants inactivateurs de la CASP-2 et qu'elles permettaient de protéger de la perte synaptique induite par des oligomères A β_{1-42} sur des cultures de neurones de l'hippocampe. Cx : neurones corticaux, Hi : neurones hippocampiques.

PERSPECTIVES A COURT ET MOYEN TERMES

Efficacité et sélectivité, peut-on aller encore plus loin?

- Afin de clarifier les mécanismes d'action de ces inactivateurs, des études structurales par cristallographie aux rayons X et spectrométrie de masse pourraient être réalisées avec le composé LJ3a. Ces données pourraient ensuite être exploitées pour identifier les interactions atomiques entre le peptide inhibiteur et le site actif, ces éléments permettront de proposer des analogues optimisés.
- Les données obtenues par modélisation moléculaire, au niveau de la dynamique du pont disulfure situé à l'interface de dimérisation ainsi que celle du réseau de molécules d'eau établi dans cette zone, devront être approfondies et pourraient être exploitées pour la conception de modulateurs allostériques de la CASP-2.
- À plus long terme, dans une perspective d'optimisation des composés, la stratégie s'orienterait plutôt vers la conception de molécules bi-fonctionnelles, où l'on pourrait associer les composés LJ2a à LJ3a qui ciblent le site actif à des composés ciblant l'interface de dimérisation.

Approfondir l'étude du rôle de la Caspase-2 au niveau de la synapse

- L'effet synaptoprotecteur des composés LJ2a et LJ3a devra être évalué sur les réseaux de neurones Cortex/Hippocampe afin de valider les effets obtenus sur les cultures de neurones de l'hippocampe. Ces expériences devront également valider le fait que l'augmentation de l'efficacité et/ou de la sélectivité des molécules envers la CASP-2 permettent de diminuer les doses de composé utilisées, comme nous avons pu le mettre en évidence sur les cultures hippocampiques.
- Dans ce modèle, le lien entre l'agrégation de Tau et la pathogénicité du peptide βamyloïde en présence ou en absence d'inhibiteur de CASP-2, pourrait être approfondi en étudiant la localisation subcellulaire de Tau à des doses toxiques et sub-toxiques de peptide amyloïde.
- Les effets des inhibiteurs pourraient également être confrontés à de nouvelles expériences réalisés sur des cultures primaires de neurones issus des souris CASP-2^{flox/flox}.
- Les composés LJ2a et LJ3a pourront être testés dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Les souris J20, qui surexpriment une forme mutée de la protéine

PERSPECTIVES A COURT ET MOYEN TERMES

précurseur amyloïde humaine (mutations Swedish (K670N/M671L) et Indiana (V717F)), constituent de bons modèles d'étude. En effet, les animaux développent rapidement des plaques amyloïdes et ont un déclin de la mémoire âge-dépendant. À partir de ces modèles soumis à l'effet des molécules, l'état des synapses *in situ* pourrait être analysé. De plus, pour étudier un rôle de la CASP-2 à des étapes précoces de la pathologie, l'effet des molécules pourrait aussi être évalué sur des animaux où les oligomères Aβ sont injectés par stéréotaxie.

Dans une perspective de développement, la toxicité ainsi que les études de pharmacodynamique et pharmacocinétique (PK/PD) pourraient être réalisées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abderrazak, A., El Hadri, K., Bosc, E., Blondeau, B., Slimane, M.-N., Büchele, B., Simmet, T., Couchie, D., and Rouis, M. (2016). Inhibition of the Inflammasome NLRP3 by Arglabin Attenuates Inflammation, Protects Pancreatic β-Cells from Apoptosis, and Prevents Type 2 Diabetes Mellitus Development in ApoE2Ki Mice on a Chronic High-Fat Diet. J. Pharmacol. Exp. Ther. *357*, 487–494.
- Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281, 1322–1326.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. Immunity *20*, 319–325.
- Ahmed, Z., Kalinski, H., Berry, M., Almasieh, M., Ashush, H., Slager, N., Brafman, A., Spivak, I., Prasad, N., Mett, I., et al. (2011). Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2. Cell Death Dis 2, e173.
- Akpan, N., Serrano-Saiz, E., Zacharia, B.E., Otten, M.L., Ducruet, A.F., Snipas, S.J., Liu, W., Velloza, J., Cohen, G., Sosunov, S.A., et al. (2011). Intranasal delivery of caspase-9 inhibitor reduces caspase-6-dependent axon/neuron loss and improves neurological function after stroke. J Neurosci 31, 8894–8904.
- Aksenova, V.I., Bylino, O.V., Zhivotovskiĭ, B.D., and Lavrik, I.N. (2013). [Caspase-2: what do we know today?]. Mol. Biol. (Mosk.) 47, 187–204.
- Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. FEBS J. 276, 6063–6073.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., and Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. Nat. Cell Biol. *5*, 647–654.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell *87*, 171.
- Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Rönnstrand, L., Wernstedt, C., and Andersson, T. (2004). p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils. J Exp Med 199, 449–458.
- Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.-A., and Avadhani, N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. J. Cell Biol. *161*, 41–54.
- Andersen, J.L., Johnson, C.E., Freel, C.D., Parrish, A.B., Day, J.L., Buchakjian, M.R., Nutt, L.K., Thompson, J.W., Moseley, M.A., and Kornbluth, S. (2009). Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. EMBO J. 28, 3216–3227.
- Ando, K., Kernan, J.L., Liu, P.H., Sanda, T., Logette, E., Tschopp, J., Look, A.T., Wang, J., Bouchier-Hayes, L., and Sidi, S. (2012). PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. Mol. Cell 47, 681–693.
- Ando, K., Parsons, M.J., Shah, R.B., Charendoff, C.I., Paris, S.L., Liu, P.H., Fassio, S.R., Rohrman, B.A., Thompson, R., Oberst, A., et al. (2017). NPM1 directs PIDDosome-dependent caspase-2 activation in the nucleolus. J. Cell Biol. *216*, 1795–1810.
- Angelo, P.F., Lima, A.R., Alves, F.M., Blaber, S.I., Scarisbrick, I.A., Blaber, M., Juliano, L., and Juliano, M.A. (2006). Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. J. Biol. Chem. 281, 3116–3126.
- Angliker, H., Wikstrom, P., Rauber, P., and Shaw, E. (1987). The synthesis of lysylfluoromethanes and their properties as inhibitors of trypsin, plasmin and cathepsin B. Biochem. J. 241, 871–875.
- Arama, D.P., Soualmia, F., Lisowski, V., Longevial, J.-F., Bosc, E., Maillard, L.T., Martinez, J., Masurier, N., and El Amri, C. (2015). Pyrido-imidazodiazepinones as a new class of reversible inhibitors of human kallikrein 7. Eur J Med Chem *93*, 202–213.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (2002). Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. Proteins *46*, 355–367.
- Artola, A., Bröcher, S., and Singer, W. (1990). Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. Nature *347*, 69–72.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. Science 281, 1305–1308.
- Ashkenazi, A., and Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *30*, 337–356.
- Aziz, M., Jacob, A., and Wang, P. (2014). Revisiting caspases in sepsis. Cell Death Dis 5, e1526.
- Bachurin, S.O., Bovina, E.V., and Ustyugov, A.A. (2017). Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. Med Res Rev *37*, 1186–1225.

- Baena-Lopez, L.A., Arthurton, L., Xu, D.C., and Galasso, A. (2017). Non-apoptotic Caspase regulation of stem cell properties. Seminars in Cell & Developmental Biology.
- Baillie, T.A. (2016). Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 55, 13408–13421.
- Baliga, B.C., Read, S.H., and Kumar, S. (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. Cell Death Differ. 11, 1234–1241.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A.M., and Prives, C. (2008). Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner. Cell Cycle 7, 1133–1138.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. Semin. Immunol. 15, 185– 193.
- Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol. Chem. 382, 727–733.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. Curr. Opin. Cell Biol. 13, 738–747.
- Bauer, R.A. (2015). Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. Drug Discovery Today *20*, 1061–1073.
- Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nat. Neurosci. *3*, 1291–1300.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Biochemistry (W H Freeman).
- Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C., et al. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev. 12, 1304– 1314.
- Bertoldo, J.B., Rodrigues, T., Dunsmore, L., Aprile, F.A., Marques, M.C., Rosado, L.A., Boutureira, O., Steinbrecher, T.B., Sherman, W., Corzana, F., et al. (2017). A Water-Bridged Cysteine-Cysteine Redox Regulation Mechanism in Bacterial Protein Tyrosine Phosphatases. Chem *3*, 665–677.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. J Clin Invest *115*, 1449–1457.
- Bhalla, K.N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. Oncogene 22, 9075–9086.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.-E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., et al. (2003). A Unified Model for Apical Caspase Activation. Molecular Cell *11*, 529–541.
- Boatright, K.M., Deis, C., Denault, J.-B., Sutherlin, D.P., and Salvesen, G.S. (2004). Activation of caspases-8 and 10 by FLIP(L). Biochem. J. *382*, 651–657.
- Boland, B., Yu, W.H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezard, E., Pastores, G.M., Rubinsztein, D.C., Nixon,
 R.A., Duchen, M.R., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. Nat Rev Drug Discov *17*, 660–688.
- Bolognin, S., Lorenzetto, E., Diana, G., and Buffelli, M. (2014). The potential role of rho GTPases in Alzheimer's disease pathogenesis. Mol. Neurobiol. *50*, 406–422.
- Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2006). Caspase-2–induced Apoptosis Requires Bid Cleavage: A Physiological Role for Bid in Heat Shock–induced Death. Mol Biol Cell *17*, 2150–2157.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., et al. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron *17*, 1005–1013.
- Bosc, E., Nastri, J., Lefort, V., Valli, M., Contiguiba, F., Pioli, R., Furlan, M., Bolzani, V. da S., El Amri, C., and Reboud-Ravaux, M. (2018). Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 496, 961–966.
- Bouchier-Hayes, L. (2010). The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. J Cell Mol Med 14, 1212–1224.
- Bouchier-Hayes, L., and Green, D.R. (2012). Caspase-2: the orphan caspase. Cell Death Differ. 19, 51–57.
- Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G.P., Connell, S., Tait, S.W.G., Dillon, C.P., Flanagan, J.M., Beere, H.M., and Green, D.R. (2009). Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. Mol. Cell *35*, 830–840.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. Brain Pathol. *1*, 213–216.
- Braak, H., Braak, E., and Strothjohann, M. (1994). Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. Neurosci. Lett. *171*, 1–4.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., and Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer diseaseassociated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol. *112*, 389–404.
- Brady, S.C., Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2005). Regulation of Caspase 9 through Phosphorylation by Protein Kinase C Zeta in Response to Hyperosmotic Stress. Mol Cell Biol 25, 10543–10555.
- Braga, M., Sinha Hikim, A.P., Datta, S., Ferrini, M.G., Brown, D., Kovacheva, E.L., Gonzalez-Cadavid, N.F., and Sinha-Hikim, I. (2008). Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. Apoptosis *13*, 822–832.
- Brömme, D., Smith, R.A., Coles, P.J., Kirschke, H., Storer, A.C., and Krantz, A. (1994). Potent inactivation of cathepsins S and L by peptidyl (acyloxy)methyl ketones. Biol. Chem. Hoppe-Seyler *375*, 343–347.
- Bronner, D.N., O'Riordan, M.X.D., and He, Y. (2013). Caspase-2 mediates a Brucella abortus RB51-induced hybrid cell death having features of apoptosis and pyroptosis. Front Cell Infect Microbiol *3*, 83.
- Bronner, D.N., Abuaita, B.H., Chen, X., Fitzgerald, K.A., Nuñez, G., He, Y., Yin, X.-M., and O'Riordan, M.X.D. (2015).
 Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. Immunity 43, 451–462.
- Broom, A.D. (1989). Rational design of enzyme inhibitors: multisubstrate analogue inhibitors. J. Med. Chem. 32, 2–7.
- Bulat, N., and Widmann, C. (2009). Caspase substrates and neurodegenerative diseases. Brain Res. Bull. *80*, 251–267.
- Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G., and Kumar, S. (1998). Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. J. Biol. Chem. 273, 6763–6768.
- Callus, B.A., and Vaux, D.L. (2007). Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. Cell Death Differ. 14, 73–78.
- Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2003). Apoptotic Pathway and MAPKs Differentially Regulate Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones. Neuron *37*, 939–952.
- Campbell, D.S., and Okamoto, H. (2013). Local caspase activation interacts with Slit-Robo signaling to restrict axonal arborization. J Cell Biol 203, 657–672.
- Carlsson, Y., Schwendimann, L., Vontell, R., Rousset, C.I., Wang, X., Lebon, S., Charriaut-Marlangue, C., Supramaniam, V., Hagberg, H., Gressens, P., et al. (2011). Genetic inhibition of caspase-2 reduces hypoxic-ischemic and excitotoxic neonatal brain injury. Ann. Neurol. *70*, 781–789.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis *8*, 345–352.
- Cecarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M., Keller, J.N., and Eleuteri, A.M. (2016). The fine-tuning of proteolytic pathways in Alzheimer's disease. Cell. Mol. Life Sci. *73*, 3433–3451.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., and Cannizzaro, L.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science 256, 97–100.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. Cell *107*, 399–407.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Hamandi, K., Mullan, M., Goate, A., Hardy, J., Backhovens, H., Martin, J.J., and Broeckhoven, C.V. (1991). Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val----Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. *129*, 134–135.
- Chauvier, D., Lecoeur, H., Langonné, A., Borgne-Sanchez, A., Mariani, J., Martinou, J.-C., Rebouillat, D., and Jacotot, E. (2005). Upstream control of apoptosis by caspase-2 in serum-deprived primary neurons. Apoptosis *10*, 1243–1259.
- Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., and Jacotot, E. (2007). Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? Cell Death and Differentiation *14*, 387–391.
- Chauvier, D., Renolleau, S., Holifanjaniaina, S., Ankri, S., Bezault, M., Schwendimann, L., Rousset, C., Casimir, R., Hoebeke, J., Smirnova, M., et al. (2011). Targeting neonatal ischemic brain injury with a pentapeptidebased irreversible caspase inhibitor. Cell Death Dis *2*, e203.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C., and Galliot, B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. Dev. Cell *17*, 279–289.
- Chu, J., Li, J.-G., Joshi, Y.B., Giannopoulos, P.F., Hoffman, N.E., Madesh, M., and Praticò, D. (2015). Gamma secretase-activating protein is a substrate for caspase-3: implications for Alzheimer's disease. Biol. Psychiatry 77, 720–728.

Clark, A.C. (2016). Caspase Allostery and Conformational Selection. Chem. Rev. 116, 6666–6706.

Colussi, P.A., Harvey, N.L., and Kumar, S. (1998). Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. J. Biol. Chem. *273*, 24535–24542.

Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. Trends Microbiol. 9, 113– 114.

Copeland, R.A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. Methods Biochem Anal *46*, 1–265.

Copeland, R.A., Harpel, M.R., and Tummino, P.J. (2007). Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. Expert Opin. Ther. Targets *11*, 967–978.

- Côté, J., Dupuis, S., Jiang, Z.-H., and Wu, J.Y. (2001a). Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 938–943.
- Côté, J., Dupuis, S., and Wu, J.Y. (2001b). Polypyrimidine Track-binding Protein Binding Downstream of Caspase-2 Alternative Exon 9 Represses Its Inclusion*. J Biol Chem *276*, 8535–8543.
- Cromm, P.M., and Crews, C.M. (2017). The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. ACS Cent Sci *3*, 830–838.
- Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J. Virol. *67*, 2168–2174.
- Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2009). Caspase activation pathways: some recent progress. Cell Death and Differentiation 16, 935–938.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., and Zhong, K. (2018). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. Alzheimers Dement (N Y) 4, 195–214.
- Cusack, C.L., Swahari, V., Hampton Henley, W., Michael Ramsey, J., and Deshmukh, M. (2013). Distinct pathways mediate axon degeneration during apoptosis and axon-specific pruning. Nat Commun *4*, 1876.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. Cell *152*, 519–531.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 49–63.
- Dagbay, K., Eron, S.J., Serrano, B.P., Velázquez-Delgado, E.M., Zhao, Y., Lin, D., Vaidya, S., and Hardy, J.A. (2014). A multi-pronged approach for compiling a global map of allosteric regulation in the apoptotic caspases. Methods Enzymol *544*, 215–249.
- Dahal, G.R., Karki, P., Thapa, A., Shahnawaz, M., Shin, S.Y., Lee, J.S., Cho, B., and Park, I.-S. (2007). Caspase-2 cleaves DNA fragmentation factor (DFF45)/Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). Archives of Biochemistry and Biophysics 468, 134–139.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS ONE *5*, e8668.
- Datta, D., McClendon, C.L., Jacobson, M.P., and Wells, J.A. (2013). Substrate and Inhibitor-induced Dimerization and Cooperativity in Caspase-1 but Not Caspase-3. J. Biol. Chem. *288*, 9971–9981.
- Dawar, S., Lim, Y., Puccini, J., White, M., Thomas, P., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2017). Caspase-2-mediated cell death is required for deleting aneuploid cells. Oncogene *36*, 2704–2714.
- De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W., and Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. Blood 100, 1310–1317.
- De Cesco, S., Kurian, J., Dufresne, C., Mittermaier, A.K., and Moitessier, N. (2017). Covalent inhibitors design and discovery. European Journal of Medicinal Chemistry *138*, 96–114.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. Physiol. Rev. *90*, 465–494.
- De Strooper, B., Vassar, R., and Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol *6*, 99–107.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. Oncogene 22, 8543–8567.
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., et al. (2014). β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. Acta Neuropathol Commun *2*, 145.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepied, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J.-P., et al. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. Nat. Cell Biol. *9*, 666–674.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. J Cell Biol 180, 451–458.

Desvergne, A., Genin, E., Maréchal, X., Gallastegui, N., Dufau, L., Richy, N., Groll, M., Vidal, J., and Reboud-Ravaux,
 M. (2013). Dimerized linear mimics of a natural cyclopeptide (TMC-95A) are potent noncovalent inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome. J. Med. Chem. 56, 3367–3378.

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev. 13, 239–252.

- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Petraki, C., and Soosaipillai, A.R. (2000). Human kallikrein 6 as a biomarker of alzheimer's disease. Clin. Biochem. *33*, 663–667.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Cain, K., and MacFarlane, M. (2012). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. Mol Cell 47, 291–305.
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S., and Kumar, S. (2012). Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. Cell Death Differ. *19*, 1288–1298.
- Dorstyn, L., Puccini, J., Nikolic, A., Shalini, S., Wilson, C.H., Norris, M.D., Haber, M., and Kumar, S. (2014). An unexpected role for caspase-2 in neuroblastoma. Cell Death Dis *5*, e1383.
- Dorstyn, L., Akey, C.W., and Kumar, S. (2018). New insights into apoptosome structure and function. Cell Death Differ. 25, 1194–1208.
- Drag, M., and Salvesen, G.S. (2010). Emerging principles in protease-based drug discovery. Nat Rev Drug Discov 9, 690–701.
- Du, Q.-S., Xie, N.-Z., and Huang, R.-B. (2015). Recent development of peptide drugs and advance on theory and methodology of peptide inhibitor design. Med Chem *11*, 235–247.

Duan, H., and Dixit, V.M. (1997). RAIDD is a new "death" adaptor molecule. Nature 385, 86–89.

- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep. *7*, 988–994.
- Ekert, P.G., Silke, J., and Vaux, D.L. (1999). Caspase inhibitors. Cell Death Differ. 6, 1081–1086.
- Ekici, O.D., Götz, M.G., James, K.E., Li, Z.Z., Rukamp, B.J., Asgian, J.L., Caffrey, C.R., Hansell, E., Dvorák, J., McKerrow, J.H., et al. (2004). Aza-peptide Michael acceptors: a new class of inhibitors specific for caspases and other clan CD cysteine proteases. J. Med. Chem. 47, 1889–1892.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature *391*, 43–50.
- Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. Nat. Neurosci. *6*, 136–143.
- Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H., and Lazebnik, Y. (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. EMBO J. *16*, 2271–2281.
- Fava, L.L., Bock, F.J., Geley, S., and Villunger, A. (2012). Caspase-2 at a glance. J. Cell. Sci. 125, 5911–5915.
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.-W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., and Alnemri, E.S. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell Death Differ. 14, 1590–1604.
- Fernando, P., Brunette, S., and Megeney, L.A. (2005). Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. FASEB J. 19, 1671–1673.
- Fischer, U., and Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. Pharmacol. Rev. *57*, 187–215.
- Friedlander, R.M. (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. N. Engl. J. Med. 348, 1365–1375.
- Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Hara, H., Fink, K.B., Li, W., MacDonald, G., Fishman, M.C., Greenberg, A.H., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (1997). Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 beta converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. J. Exp. Med. *185*, 933–940.
- Fu, T.-M., Li, Y., Lu, A., Li, Z., Vajjhala, P.R., Cruz, A.C., Srivastava, D.B., DiMaio, F., Penczek, P.A., Siegel, R.M., et al. (2016). Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. Mol. Cell 64, 236–250.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J *384*, 201–232.
- Fujiwara, K., Toda, H., and Ikeguchi, M. (2012). Dependence of α-helical and β-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. BMC Struct Biol *12*, 18.
- Fushimi, K., Ray, P., Kar, A., Wang, L., Sutherland, L.C., and Wu, J.Y. (2008). Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 15708– 15713.

- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., and Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. Immunity 44, 221–231.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. *25*, 486–541.
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., et al. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 10032–10037.

Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. J. Biol. Chem. *273*, 32608–32613.

- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Zamboni, R., Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1999). Purification and catalytic properties of human caspase family members. Cell Death Differ. *6*, 362–369.
- Garcia-Carreon, F.L. (1997). Classification of Proteases without tears. Biochemical Education 25, 161–167.
- Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., et al. (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloidbeta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. Cell *97*, 395–406.
- Ghosh, A.S., Wang, B., Pozniak, C.D., Chen, M., Watts, R.J., and Lewcock, J.W. (2011). DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. J. Cell Biol. *194*, 751–764.
- Ghosh, D., Lahiri, P., Verma, H., Mukherjee, S., and Chatterjee, J. (2016). Engineering β-sheets employing Nmethylated heterochiral amino acids. Chem. Sci. 7, 5212–5218.
- Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2006). A century of Alzheimer's disease. Science 314, 777–781.
- Gouvea, I.E., Judice, W.A.S., Cezari, M.H.S., Juliano, M.A., Juhász, T., Szeltner, Z., Polgár, L., and Juliano, L. (2006). Kosmotropic salt activation and substrate specificity of poliovirus protease 3C. Biochemistry 45, 12083– 12089.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. Cell *125*, 1179–1191.
- Green, D.R., and Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 7.
- Green, D.R., and Melino, G. (2001). ICE heats up. Cell Death Differ. 8, 549–550.
- Groninger, E., Meeuwsen-De Boer, G.J., De Graaf, S.S.N., Kamps, W.A., and De Bont, E.S.J.M. (2002). Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? Int. J. Oncol. *21*, 1339–1345.
- Guha, M., Xia, F., Raskett, C.M., and Altieri, D.C. (2010). CASPASE 2-MEDIATED TUMOR SUPPRESSION INVOLVES SURVIVIN GENE SILENCING. Oncogene *29*, 1280–1292.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. J. Biol. Chem. 277, 13430–13437.
- Guo, Z., Yan, Z., Zhou, X., Wang, Q., Lu, M., Liu, W., Zhou, H., Yang, C., and McClain, E.J. (2015). Synthesis and biological evaluation of novel 1,2-benzisothiazol-3-one-derived 1,2,3-triazoles as caspase-3 inhibitors. Med Chem Res 24, 1814–1829.
- Halff, E.F., Diebolder, C.A., Versteeg, M., Schouten, A., Brondijk, T.H.C., and Huizinga, E.G. (2012). Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. J. Biol. Chem. *287*, 38460–38472.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat. Immunol. *9*, 857–865.
- Han, M.-H., Jiao, S., Jia, J.-M., Chen, Y., Chen, C.Y., Gucek, M., Markey, S.P., and Li, Z. (2013). The novel caspase-3 substrate Gap43 is involved in AMPA receptor endocytosis and long-term depression. Mol. Cell Proteomics *12*, 3719–3731.
- Hara, H., Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1997). Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 2007–2012.
- Hardy, J.A., Lam, J., Nguyen, J.T., O'Brien, T., and Wells, J.A. (2004). Discovery of an allosteric site in the caspases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 12461–12466.
- Harvey, N.L., Butt, A.J., and Kumar, S. (1997). Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis. J. Biol. Chem. 272, 13134–13139.

- Hauenstein, A.V., Zhang, L., and Wu, H. (2015). The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. Curr. Opin. Struct. Biol. *31*, 75–83.
- Heneka, M.T., and O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. J. Neuroimmunol. 184, 69–91.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature 493, 674–678.
- Henninot, A., Collins, J.C., and Nuss, J.M. (2018). The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? J. Med. Chem. *61*, 1382–1414.
- Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, A.S., Logvinova, A.V., Peel, A.L., Chen, S.F., et al. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. Cell Death Differ. *11*, 424–438.
- Hilbi, H., Chen, Y., Thirumalai, K., and Zychlinsky, A. (1997). The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during Shigella flexneri-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun. *65*, 5165–5170.
- Ho, L.H., Read, S.H., Dorstyn, L., Lambrusco, L., and Kumar, S. (2008). Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. Oncogene *27*, 3393–3404.
- Ho, L.H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., and Kumar, S. (2009). A tumor suppressor function for caspase-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 5336–5341.
- Ho, P.-K., Jabbour, A.M., Ekert, P.G., and Hawkins, C.J. (2005). Caspase-2 is resistant to inhibition by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and can activate caspase-7. FEBS J. 272, 1401–1414.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., et al. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. Mol. Cell. Biol. 23, 1428–1440.
- Hollville, E., and Deshmukh, M. (2017). Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. Semin. Cell Dev. Biol.
- Hook, G., Jacobsen, J.S., Grabstein, K., Kindy, M., and Hook, V. (2015). Cathepsin B is a New Drug Target for Traumatic Brain Injury Therapeutics: Evidence for E64d as a Promising Lead Drug Candidate. Front Neurol 6, 178.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature 458, 514–518.
- Howley, B., and Fearnhead, H.O. (2008). Caspases as therapeutic targets. J. Cell. Mol. Med. 12, 1502–1516.
- Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z., Yan, C., He, T., Liang, Q., and Shi, Y. (2014). Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 16254– 16261.
- Huang, X., Knoell, C.T., Frey, G., Hazegh-Azam, M., Tashjian, A.H., Hedstrom, L., Abeles, R.H., and Timasheff, S.N. (2001). Modulation of recombinant human prostate-specific antigen: activation by Hofmeister salts and inhibition by azapeptides. Appendix: thermodynamic interpretation of the activation by concentrated salts. Biochemistry 40, 11734–11741.
- Hyman, B.T., and Yuan, J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. Nat. Rev. Neurosci. 13, 395–406.
- Ippagunta, S.K., Malireddi, R.K.S., Shaw, P.J., Neale, G.A., Vande Walle, L., Green, D.R., Fukui, Y., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. Nat. Immunol. *12*, 1010– 1016.
- Ishizaki, Y., Jacobson, M.D., and Raff, M.C. (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. J. Cell Biol. 140, 153–158.
- Jabbour, A.M., Ekert, P.G., Coulson, E.J., Knight, M.J., Ashley, D.M., and Hawkins, C.J. (2002). The p35 relative, p49, inhibits mammalian and Drosophila caspases including DRONC and protects against apoptosis. Cell Death Differ. *9*, 1311–1320.
- Jacquel, A., Benikhlef, N., Paggetti, J., Lalaoui, N., Guery, L., Dufour, E.K., Ciudad, M., Racoeur, C., Micheau, O., Delva, L., et al. (2009). Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. Blood *114*, 3633–3641.
- Jang, T., and Park, H.H. (2013). PIDD mediates and stabilizes the interaction between RAIDD and Caspase-2 for the PIDDosome assembly. BMB Rep *46*, 471–476.

- Janssens, S., and Tinel, A. (2012). The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. Cell Death Differ. 19, 13–20.
- Jean, Y.Y., Ribe, E.M., Pero, M.E., Moskalenko, M., Iqbal, Z., Marks, L.J., Greene, L.A., and Troy, C.M. (2013). Caspase-2 is essential for c-Jun transcriptional activation and Bim induction in neuron death. Biochem. J. 455, 15–25.
- Jiao, S., and Li, Z. (2011). Non-apoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission. Neuron *70*, 758–772.
- Jiménez Fernández, D., and Lamkanfi, M. (2015). Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. Biol. Chem. *396*, 193–203.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. Cell *137*, 721–735.
- Johnston, M.V., Nakajima, W., and Hagberg, H. (2002). Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. Neuroscientist *8*, 212–220.
- Jorgensen, I., and Miao, E.A. (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Immunol. Rev. 265, 130–142.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. Cell Death Differ. 24, 1380–1389.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 584, 1287–1295.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature 479, 117–121.
- Kempf, D.J., Sham, H.L., Marsh, K.C., Flentge, C.A., Betebenner, D., Green, B.E., McDonald, E., Vasavanonda, S., Saldivar, A., Wideburg, N.E., et al. (1998). Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy. J. Med. Chem. 41, 602–617.
- Kennedy, N.J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R.C. (1999). Caspase Activation Is Required for T Cell Proliferation. J Exp Med *190*, 1891–1896.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer *26*, 239–257.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet *377*, 942–955.
- Kim, J.Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R., Kaufman, R.J., Saltiel, A.R., and Karin, M. (2018). ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P. Cell 175, 133-145.e15.
- Kim, Y.M., Kim, T.H., Chung, H.T., Talanian, R.V., Yin, X.M., and Billiar, T.R. (2000). Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. Hepatology 32, 770–778.
- Kitevska, T., Spencer, D.M.S., and Hawkins, C.J. (2009). Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? Apoptosis 14, 829–848.
- Klemenčič, M., and Funk, C. (2018). Structural and functional diversity of caspase homologues in non-metazoan organisms. Protoplasma 255, 387–397.
- Kolbus, A., Pilat, S., Husak, Z., Deiner, E.M., Stengl, G., Beug, H., and Baccarini, M. (2002). Raf-1 Antagonizes Erythroid Differentiation by Restraining Caspase Activation. J Exp Med *196*, 1347–1353.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ. 7, 1166–1173.
- Krantz, A., Copp, L.J., Coles, P.J., Smith, R.A., and Heard, S.B. (1991). Peptidyl (acyloxy)methyl ketones and the quiescent affinity label concept: the departing group as a variable structural element in the design of inactivators of cysteine proteinases. Biochemistry 30, 4678–4687.
- Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annu. Rev. Biochem. 46, 331–358.
- Kravchenko, D.V., Kysil, V.M., Tkachenko, S.E., Maliarchouk, S., Okun, I.M., and Ivachtchenko, A.V. (2005). Pyrrolo[3,4-c]quinoline-1,3-diones as potent caspase-3 inhibitors. Synthesis and SAR of 2-substituted 4methyl-8-(morpholine-4-sulfonyl)-pyrrolo[3,4-c]quinoline-1,3-diones. Eur J Med Chem 40, 1377–1383.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., and Villunger, A. (2009a). Caspase-2: killer, savior and safeguard—emerging versatile roles for an ill-defined caspase. Oncogene 28, 3093–3096.
- Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C., and Villunger, A. (2009b). The enigma of caspase-2: the laymen's view. Cell Death Differ 16, 195–207.
- Kudelova, J., Fleischmannova, J., Adamova, E., and Matalova, E. (2015). Pharmacological caspase inhibitors: research towards therapeutic perspectives. J. Physiol. Pharmacol. *66*, 473–482.

- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. Science 267, 2000–2003.
- Kumar, S. (2009). Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? Nat. Rev. Cancer *9*, 897–903.
- Kumar, S., and Vaux, D.L. (2002). Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage. Science 297, 1290–1291.
- Kumar, S., Tomooka, Y., and Noda, M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally downregulated expression in the mouse brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *185*, 1155–1161.
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1994). Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. Genes Dev. 8, 1613–1626.
- Kumar, S., White, D.L., Takai, S., Turczynowicz, S., Juttner, C.A., and Hughes, T.P. (1995). Apoptosis regulatory gene NEDD2 maps to human chromosome segment 7q34-35, a region frequently affected in haematological neoplasms. Hum. Genet. *95*, 641–644.
- Kuo, C.T., Zhu, S., Younger, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). Identification of E2/E3 ubiquitinating enzymes and caspase activity regulating Drosophila sensory neuron dendrite pruning. Neuron *51*, 283–290.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S., and Miura, M. (2006). Drosophila IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. Cell 126, 583–596.
- Lagoutte, R., Patouret, R., and Winssinger, N. (2017). Covalent inhibitors: an opportunity for rational target selectivity. Curr Opin Chem Biol *39*, 54–63.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell 157, 1013–1022.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. Cell Death Differ. *9*, 358–361.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Caspases leave the beaten track: caspase-mediated activation of NF-kappaB. J. Cell Biol. *173*, 165–171.
- Larsen, B.D., Rampalli, S., Burns, L.E., Brunette, S., Dilworth, F.J., and Megeney, L.A. (2010). Caspase 3/caspaseactivated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 4230–4235.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. Science 297, 1352–1354.
- Lau, J.L., and Dunn, M.K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. Bioorganic & Medicinal Chemistry *26*, 2700–2707.
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. Oncogene 24, 5137–5148.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C., and Hammond, J. (1999). Caspase-6 Role in Apoptosis of Human Neurons, Amyloidogenesis, and Alzheimer's Disease. J. Biol. Chem. *274*, 23426–23436.
- Lee, D., Long, S.A., Adams, J.L., Chan, G., Vaidya, K.S., Francis, T.A., Kikly, K., Winkler, J.D., Sung, C.-M., Debouck, C., et al. (2000). Potent and Selective Nonpeptide Inhibitors of Caspases 3 and 7 Inhibit Apoptosis and Maintain Cell Functionality. J. Biol. Chem. 275, 16007–16014.
- Lee, D., Long, S.A., Murray, J.H., Adams, J.L., Nuttall, M.E., Nadeau, D.P., Kikly, K., Winkler, J.D., Sung, C.M., Ryan, M.D., et al. (2001a). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. J. Med. Chem. 44, 2015–2026.
- Lee, S.H., Stehlik, C., and Reed, J.C. (2001b). Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. J. Biol. Chem. *276*, 34495–34500.
- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S., and Li, C.-Y. (2010a). Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci Signal *3*, ra13.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell *94*, 491–501.
- Li, M., Ona, V.O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., et al. (2000). Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. Science *288*, 335–339.
- Li, Y., Zhou, M., Hu, Q., Bai, X.-C., Huang, W., Scheres, S.H.W., and Shi, Y. (2017). Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 1542–1547.
- Li, Z., Jo, J., Jia, J.-M., Lo, S.-C., Whitcomb, D.J., Jiao, S., Cho, K., and Sheng, M. (2010b). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. Cell *141*, 859–871.
- Linton, S.D. (2005). Caspase inhibitors: a pharmaceutical industry perspective. Curr Top Med Chem 5, 1697–1717.

- Linton, S.D., Aja, T., Armstrong, R.A., Bai, X., Chen, L.-S., Chen, N., Ching, B., Contreras, P., Diaz, J.-L., Fisher, C.D., et al. (2005). First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. J. Med. Chem. *48*, 6779–6782.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., et al. (2000). Epidermal differentiation does not involve the proapoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. Cell Death and Differentiation 7, 1218–1224.
- Liu, D., Tian, Z., Yan, Z., Wu, L., Ma, Y., Wang, Q., Liu, W., Zhou, H., and Yang, C. (2013). Design, synthesis and evaluation of 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as potent caspase-3 inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 21, 2960–2967.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., and Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. Nature *535*, 153–158.
- Lloret, A., Fuchsberger, T., Giraldo, E., and Viña, J. (2015). Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. *83*, 186–191.
- Logette, E., Wotawa, A., Solier, S., Desoche, L., Solary, E., and Corcos, L. (2003). The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. Oncogene 22, 935–946.
- Logette, E., Solary, E., and Corcos, L. (2005). Identification of a functional DNA binding site for the SREBP-1c transcription factor in the first intron of the human caspase-2 gene. Biochim. Biophys. Acta *1738*, 1–5.
- Lonsdale, R., and Ward, R.A. (2018). Structure-based design of targeted covalent inhibitors. Chem Soc Rev 47, 3816–3830.
- Loo, G. van, Saelens, X., Matthijssens, F., Schotte, P., Beyaert, R., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). Caspases are not localized in mitochondria during life or death. Cell Death and Differentiation *9*, 1207–1211.
- Lopez-Cruzan, M., and Herman, B. (2013). Loss of caspase-2 accelerates age-dependent alterations in mitochondrial production of reactive oxygen species. Biogerontology *14*, 121–130.
- López-Otín, C., and Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. J. Biol. Chem. 283, 30433–30437.
- Lu, A., and Wu, H. (2015). Structural mechanisms of inflammasome assembly. FEBS J. 282, 435–444.
- Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., and Egelman, E.H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. Cell 156, 1193–1206.
- Lv, Z., Chu, Y., and Wang, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. HIV AIDS (Auckl) 7, 95–104.
- Ma, C., MacKenzie, S.H., and Clark, A.C. (2014). Redesigning the procaspase-8 dimer interface for improved dimerization. Protein Sci. 23, 442–453.
- Mace, P.D., and Riedl, S.J. (2010). Molecular Cell Death Platforms and Assemblies. Curr Opin Cell Biol 22, 828– 836.
- Mace, P.D., Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2014). Caspase enzymology and activation mechanisms. Meth. Enzymol. 544, 161–178.
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Jewell, M.L., Pereira, T.A., Xie, G., Premont, R.T., and Diehl, A.M. (2016). Caspase-2 promotes obesity, the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. Cell Death Dis 7, e2096.
- MacKenzie, S.H., and Clark, A.C. (2012). DEATH BY CASPASE DIMERIZATION. Adv Exp Med Biol 747.
- MacKenzie, S.H., Schipper, J.L., and Clark, A.C. (2010). The potential for caspases in drug discovery. Curr Opin Drug Discov Devel 13, 568–576.
- Madesh, M., Zong, W.-X., Hawkins, B.J., Ramasamy, S., Venkatachalam, T., Mukhopadhyay, P., Doonan, P.J., Irrinki, K.M., Rajesh, M., Pacher, P., et al. (2009). Execution of superoxide-induced cell death by the proapoptotic Bcl-2-related proteins Bid and Bak. Mol. Cell. Biol. *29*, 3099–3112.
- Mah, R., Thomas, J.R., and Shafer, C.M. (2014). Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters *24*, 33–39.
- Maillard, M.C., Brookfield, F.A., Courtney, S.M., Eustache, F.M., Gemkow, M.J., Handel, R.K., Johnson, L.C., Johnson, P.D., Kerry, M.A., Krieger, F., et al. (2011). Exploiting differences in caspase-2 and -3 S₂ subsites for selectivity: structure-based design, solid-phase synthesis and in vitro activity of novel substrate-based caspase-2 inhibitors. Bioorg. Med. Chem. *19*, 5833–5851.

- Makwana, K., Patel, S.A., Velingkaar, N., Ebron, J.S., Shukla, G.C., and Kondratov, R.V.K.V. (2017). Aging and calorie restriction regulate the expression of miR-125a-5p and its target genes Stat3, Casp2 and Stard13. Aging (Albany NY) *9*, 1825–1843.
- Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2015). Regulation of inflammasome activation. Immunol. Rev. 265, 6–21.
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., and Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. J. Cell Biol. 149, 603–612.
- Manzl, C., Krumschnabel, G., Bock, F., Sohm, B., Labi, V., Baumgartner, F., Logette, E., Tschopp, J., and Villunger, A. (2009). Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. J. Cell Biol. *185*, 291–303.
- Manzl, C., Peintner, L., Krumschnabel, G., Bock, F., Labi, V., Drach, M., Newbold, A., Johnstone, R., and Villunger, A. (2012). PIDDosome-independent tumor suppression by Caspase-2. Cell Death Differ. *19*, 1722–1732.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. Nature *430*, 213–218.
- Martin, S.J., Finucane, D.M., Amarante-Mendes, G.P., O'Brien, G.A., and Green, D.R. (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. J. Biol. Chem. 271, 28753–28756.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. Cell *117*, 561–574.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differ. 14, 10–22.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of prolL-beta. Mol. Cell *10*, 417–426.
- Mata, G., Cuesto, G., Heras, J., Morales, M., Romero, A., and Rubio, J. (2017). SynapCountJ: A Validated Tool for Analyzing Synaptic Densities in Neurons. In Biomedical Engineering Systems and Technologies, A. Fred, and H. Gamboa, eds. (Springer International Publishing), pp. 41–55.
- Matthess, Y., Raab, M., Sanhaji, M., Lavrik, I.N., and Strebhardt, K. (2010). Cdk1/cyclin B1 controls Fas-mediated apoptosis by regulating caspase-8 activity. Mol. Cell. Biol. *30*, 5726–5740.
- McArthur, K., and Kile, B.T. (2018). Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? Trends Cell Biol. 28, 475–493.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*, a008656.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 7.
- McLuskey, K., and Mottram, J.C. (2015). Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. Biochem J *466*, 219–232.
- Mendelsohn, A.R., Hamer, J.D., Wang, Z.B., and Brent, R. (2002). Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 6871–6876.
- Meraz-Ríos, M.A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., and Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease. Front Integr Neurosci 7, 59.
- Mikolajczyk, J., Scott, F.L., Krajewski, S., Sutherlin, D.P., and Salvesen, G.S. (2004). Activation and substrate specificity of caspase-14. Biochemistry 43, 10560–10569.
- Miles, M.A., Kitevska-Ilioski, T., and Hawkins, C.J. (2017). Old and Novel Functions of Caspase-2. Int Rev Cell Mol Biol 332, 155–212.
- Mittelstaedt, T., Alvaréz-Baron, E., and Schoch, S. (2010). RIM proteins and their role in synapse function. Biol. Chem. 391, 599–606.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J., and Grütter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. J. Biol. Chem. *272*, 6539–6547.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct. Funct. 27, 421–429.
- Mok, S.-A., Lund, K., and Campenot, R.B. (2009). A retrograde apoptotic signal originating in NGF-deprived distal axons of rat sympathetic neurons in compartmented cultures. Cell Res. *19*, 546–560.
- Moorwood, C., and Barton, E.R. (2014). Caspase-12 ablation preserves muscle function in the mdx mouse. Hum. Mol. Genet. 23, 5325–5341.
- Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., and Yasuda, H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. J. Biochem. *137*, 125–132.

- Murray, E.J., Grisanti, M.S., Bentley, G.V., and Murray, S.S. (1997). E64d, a membrane-permeable cysteine protease inhibitor, attenuates the effects of parathyroid hormone on osteoblasts in vitro. Metab. Clin. Exp. 46, 1090–1094.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. J. Biol. Chem. *273*, 2926–2930.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell 88, 355–365.

- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. Science 267, 1449–1456.
- Nathan, J.A., Spinnenhirn, V., Schmidtke, G., Basler, M., Groettrup, M., and Goldberg, A.L. (2013). Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. Cell *152*, 1184–1194.
- Nhan, T.Q., Liles, W.C., and Schwartz, S.M. (2006). Physiological Functions of Caspases Beyond Cell Death. Am J Pathol *169*, 729–737.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. *6*, 1028–1042.
- Oberst, A., Pop, C., Tremblay, A.G., Blais, V., Denault, J.-B., Salvesen, G.S., and Green, D.R. (2010). Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. J. Biol. Chem. 285, 16632–16642.
- Ohsawa, S., Hamada, S., Kuida, K., Yoshida, H., Igaki, T., and Miura, M. (2010). Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 13366–13371.
- Okuyama, R., Nguyen, B.-C., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M., and Dotto, G.P. (2004). High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. Dev. Cell *6*, 551–562.
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., and Jacks, T. (2011). Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. Mol. Cell 43, 57–71.
- Olson, N.E., Graves, J.D., Shu, G.L., Ryan, E.J., and Clark, E.A. (2003). Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. J. Immunol. *170*, 6065–6072.
- Onténiente, B. (2004). Natural and synthetic inhibitors of caspases: targets for novel drugs. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord *3*, 333–340.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Dertien, J., and Strahlendorf, J. (2006). Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. Brain Res. *1078*, 19–34.
- Park, H.H. (2012). Structural Features of Caspase-Activating Complexes. Int J Mol Sci 13, 4807–4818.
- Park, E.K., Jung, H.S., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, C., and Kim, K.S. (2007a). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm. Res. *56*, 45–50.
- Park, H.H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschopp, J., and Wu, H. (2007b). Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. Cell *128*, 533–546.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., and Brancolini, C. (2002). Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. J. Biol. Chem. 277, 15147–15161.
- Parrish, A.B., Freel, C.D., and Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 5.
- Patel, S., Homaei, A., El-Seedi, H.R., and Akhtar, N. (2018). Cathepsins: Proteases that are vital for survival but can also be fatal. Biomed. Pharmacother. *105*, 526–532.
- Patra, K., Soosaipillai, A., Sando, S.B., Lauridsen, C., Berge, G., Møller, I., Grøntvedt, G.R., Bråthen, G., Begcevic,
 I., Moussaud, S., et al. (2018). Assessment of kallikrein 6 as a cross-sectional and longitudinal biomarker
 for Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy *10*, 9.
- Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T.P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., et al. (2007). LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3β. Neuron *53*, 703–717.
- Pellegrini, L., Passer, B.J., Tabaton, M., Ganjei, J.K., and D'Adamio, L. (1999). Alternative, Non-secretase Processing of Alzheimer's β-Amyloid Precursor Protein during Apoptosis by Caspase-6 and -8. J. Biol. Chem. 274, 21011–21016.
- Pérez-Garijo, A. (2017). When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. Semin. Cell Dev. Biol.

Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ. 10, 26–35.

Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. Lab Chip 11, 3663–3673.

- Pochet, L., Doucet, C., Dive, G., Wouters, J., Masereel, B., Reboud-Ravaux, M., and Pirotte, B. (2000). Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of alpha-chymotrypsin and human leukocyte elastase. Bioorg. Med. Chem. 8, 1489–1501.
- Pompeiano, M., Blaschke, A.J., Flavell, R.A., Srinivasan, A., and Chun, J. (2000). Decreased apoptosis in proliferative and postmitotic regions of the Caspase 3-deficient embryonic central nervous system. J. Comp. Neurol. 423, 1–12.
- Pompl, P.N., Yemul, S., Xiang, Z., Ho, L., Haroutunian, V., Purohit, D., Mohs, R., and Pasinetti, G.M. (2003). Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. Arch. Neurol. 60, 369–376.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. J Biol Chem 284, 21777–21781.
- Pop, C., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2008). Caspase assays: identifying caspase activity and substrates in vitro and in vivo. Meth. Enzymol. 446, 351–367.
- Pop, C., Oberst, A., Drag, M., Van Raam, B.J., Riedl, S.J., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2011). FLIPL induces caspase-8 activity in the absence of interdomain caspase-8 cleavage and alters substrate specificity. Biochem J 433, 447–457.
- Poreba, M., Strózyk, A., Salvesen, G.S., and Drag, M. (2013). Caspase substrates and inhibitors. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*, a008680.
- Poreba, M., Szalek, A., Kasperkiewicz, P., Rut, W., Salvesen, G.S., and Drag, M. (2015). Small Molecule Active Site Directed Tools for Studying Human Caspases. Chem. Rev. *115*, 12546–12629.
- Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D., and James, K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. Chem. Rev. *102*, 4639–4750.
- Pozueta, J., Lefort, R., Ribe, E.M., Troy, C.M., Aran-cio, O., and Shelanski, M. (2013). Caspase-2 is required for dendritic spine and behavioral alterations in J20 APP transgenic mice. Nat Commun *4*, 1939.
- Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. Nat Rev Drug Discov 14, 183–202.
- Puccini, J., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2013a). Caspase-2 as a tumour suppressor. Cell Death Differ 20, 1133– 1139.
- Puccini, J., Shalini, S., Voss, A.K., Gatei, M., Wilson, C.H., Hiwase, D.K., Lavin, M.F., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2013b). Loss of caspase-2 augments lymphomagenesis and enhances genomic instability in Atm-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 19920–19925.
- Putcha, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A., and Johnson, E.M. (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. Neuron 29, 615–628.
- Puzzo, D., Gulisano, W., Arancio, O., and Palmeri, A. (2015). The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Aβ physiology. Neuroscience *307*, 26–36.
- Ramirez, M.L.G., and Salvesen, G.S. (2018). A primer on caspase mechanisms. Semin. Cell Dev. Biol.
- Rano, T.A., Timkey, T., Peterson, E.P., Rotonda, J., Nicholson, D.W., Becker, J.W., Chapman, K.T., and Thornberry, N.A. (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). Chem. Biol. 4, 149–155.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloidinduced neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 6364–6369.
- Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K., and Fitzgerald, K.A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. Nat. Immunol. 13, 333–342.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. 290 (Pt 1), 205-218.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. 40, D343-350.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res *44*, D343–D350.
- Read, S.H., Baliga, B.C., Ekert, P.G., Vaux, D.L., and Kumar, S. (2002). A novel Apaf-1–independent putative caspase-2 activation complex. J Cell Biol *159*, 739–745.
- Reboud-Ravaux, M., and Wakselman, M. (2009). Quinone Methides and Aza-Quinone Methides as Latent Alkylating Species in the Design of Mechanism-Based Inhibitors of Serine Proteases and β-Lactamases. In Quinone Methides, (Wiley-Blackwell), pp. 357–383.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 14250–14255.

- Ribe, E.M., Jean, Y.Y., Goldstein, R.L., Manzl, C., Stefanis, L., Villunger, A., and Troy, C.M. (2012). Neuronal caspase 2 activity and function requires RAIDD, but not PIDD. Biochem. J. 444, 591–599.
- Richy, N., Sarraf, D., Maréchal, X., Janmamode, N., Le Guével, R., Genin, E., Reboud-Ravaux, M., and Vidal, J. (2018). Structure-based design of human immuno- and constitutive proteasomes inhibitors. Eur J Med Chem 145, 570–587.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 405–413.
- Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S., and Bode, W. (2001a). Structural basis for the activation of human procaspase-7. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 14790–14795.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Snipas, S.J., and Salvesen, G.S. (2001b). Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. Biochemistry *40*, 13274–13280.
- Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R., and Shi, Y. (2005). Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. Nature 434, 926–933.
- Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craig, J.C., Duncan, I.B., Galpin, S.A., Handa, B.K., Kay, J., and Kröhn, A. (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. Science 248, 358–361.
- Robertson, J.G. (2005). Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. Biochemistry 44, 5561–5571.
- Rohn, T.T. (2010). The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. Apoptosis 15, 1403–1409.
- Rohn, T.T. (2015). Caspase Cleaved Tau in Alzheimer's Disease: A Therapeutic Target Realized. Int J Neurol Neurother 2, 014.
- Rohn, T.T., and Head, E. (2008). Caspases as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease: Is It Time to "Cut" to the Chase? Int J Clin Exp Pathol 2, 108–118.
- Rohn, T.T., Cusack, S.M., Kessinger, S.R., and Oxford, J.T. (2004). Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. Exp Cell Res 295, 215–225.
- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. Lancet Neurol 10, 83–98.
- Rotella, D.P. (2016). The Critical Role of Organic Chemistry in Drug Discovery. ACS Chem. Neurosci. 7, 1315–1316.
- Rotter, B., Kroviarski, Y., Nicolas, G., Dhermy, D., and Lecomte, M.-C. (2004). Alphall-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. Biochem. J. *378*, 161–168.
- Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003). Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. Science *302*, 1581–1584.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., et al. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. Nature 429, 75–79.
- Saleh, M., Mathison, J.C., Wolinski, M.K., Bensinger, S.J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R.J., Green, D.R., and Nicholson, D.W. (2006). Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. Nature 440, 1064–1068.
- Salmena, L., and Hakem, R. (2005). Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. J Exp Med 202, 727–732.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y.B., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cellmediated immunity. Genes Dev. 17, 883–895.
- Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., and García-Sáez, A.J. (2016). Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. EMBO J *35*, 389–401.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 10964–10967.
- Sapet, C., Simoncini, S., Loriod, B., Puthier, D., Sampol, J., Nguyen, C., Dignat-George, F., and Anfosso, F. (2006). Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. Blood *108*, 1868–1876.
- Scarisbrick, I.A., Linbo, R., Vandell, A.G., Keegan, M., Blaber, S.I., Blaber, M., Sneve, D., Lucchinetti, C.F., Rodriguez, M., and Diamandis, E.P. (2008). Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. Biol. Chem. *389*, 739–745.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 157–162.

- Schechter, I., and Berger, A. (2012). On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425, 497–502.
- Schuldiner, O., and Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. Cell. Mol. Life Sci. 72, 101– 119.
- Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. Teratology 7, 253–266.
- Schweizer, A., Briand, C., and Grutter, M.G. (2003). Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway. J. Biol. Chem. *278*, 42441–42447.
- Schweizer, A., Roschitzki-Voser, H., Amstutz, P., Briand, C., Gulotti-Georgieva, M., Prenosil, E., Binz, H.K., Capitani, G., Baici, A., Plückthun, A., et al. (2007). Inhibition of caspase-2 by a designed ankyrin repeat protein: specificity, structure, and inhibition mechanism. Structure *15*, 625–636.
- Scott, A.M., and Saleh, M. (2007). The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. Cell Death Differ. 14, 23–31.
- Scott, C.W., Sobotka-Briner, C., Wilkins, D.E., Jacobs, R.T., Folmer, J.J., Frazee, W.J., Bhat, R.V., Ghanekar, S.V., and Aharony, D. (2003). Novel small molecule inhibitors of caspase-3 block cellular and biochemical features of apoptosis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 304, 433–440.
- Seaman, J.E., Julien, O., Lee, P.S., Rettenmaier, T.J., Thomsen, N.D., and Wells, J.A. (2016). Cacidases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. Cell Death Differ. *23*, 1717–1726.
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. Nat. Cell Biol. *3*, 346–352.
- Serim, S., Haedke, U., and Verhelst, S.H.L. (2012). Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments. ChemMedChem 7, 1146–1159.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med *1*, a006189.
- Sevrioukova, I.F., and Poulos, T.L. (2010). Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 18422–18427.
- Shah, R.B., Thompson, R., and Sidi, S. (2015). A mitosis-sensing caspase activation platform? New insights into the PIDDosome. Mol Cell Oncol 3.
- Shalini, S., and Kumar, S. (2015). Caspase-2 and the oxidative stress response. Mol Cell Oncol 2.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Wilson, C., Puccini, J., Ho, L., and Kumar, S. (2012). Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. Cell Death Differ. *19*, 1370–1380.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. Cell Death Differ. 22, 526–539.
- Sharma, R., Callaway, D., Vanegas, D., Bendele, M., Lopez-Cruzan, M., Horn, D., Guda, T., Fajardo, R., Abboud-Werner, S., and Herman, B. (2014). Caspase-2 maintains bone homeostasis by inducing apoptosis of oxidatively-damaged osteoclasts. PLoS ONE *9*, e93696.
- Shaw, E., Mares-Guia, M., and Cohen, W. (1965). Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from Nα-Tosyl-L-lysine*. Biochemistry *4*, 2219–2224.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol. Cell 9, 459–470.
- Shi, Y. (2004a). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. Cell 117, 855–858.
- Shi, Y. (2004b). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. Protein Sci 13, 1979–1987.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., and Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature *514*, 187–192.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., and Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature *526*, 660–665.
- Shi, J., Gao, W., and Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. Trends Biochem. Sci. 42, 245–254.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., and Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. Mol. Cell *11*, 519–527.
- Sidi, S., Sanda, T., Kennedy, R.D., Hagen, A.T., Jette, C.A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J.F., et al. (2008). Chk1 Suppresses a Caspase-2 Apoptotic Response to DNA Damage that Bypasses p53, Bcl-2, and Caspase-3. Cell *133*, 864–877.
- Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J., and Lenardo, M.J. (1998). Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. J. Cell Biol. 141, 1243–1253.

- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., and Whitty, A. (2011). The resurgence of covalent drugs. Nature Reviews Drug Discovery 10, 307–317.
- Sladky, V., Schuler, F., Fava, L.L., and Villunger, A. (2017). The resurrection of the PIDDosome emerging roles in the DNA-damage response and centrosome surveillance. J. Cell. Sci. *130*, 3779–3787.
- Smidova, A., Alblova, M., Kalabova, D., Psenakova, K., Rosulek, M., Herman, P., Obsil, T., and Obsilova, V. 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. The FEBS Journal *0*.
- Smith, C.E., Soti, S., Jones, T.A., Nakagawa, A., Xue, D., and Yin, H. (2017). Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are Caspase Inhibitors. Cell Chem Biol *24*, 281–292.
- Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J., and Darzynkiewicz, Z. (2001). Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. Cytometry 44, 73–82.
- Songane, M., Khair, M., and Saleh, M. (2018). An updated view on the functions of caspases in inflammation and immunity. Semin. Cell Dev. Biol.
- Sordet, O., Rébé, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. Blood *100*, 4446–4453.
- Soualmia, F., Bosc, E., Amiri, S.A., Stratmann, D., Magdolen, V., Darmoul, D., Reboud-Ravaux, M., and El Amri, C. (2018). Insights into the activity control of the kallikrein-related peptidase 6: small-molecule modulators and allosterism. Biol. Chem. 399, 1073–1078.
- Spencer, B., Valera, E., Rockenstein, E., Trejo-Morales, M., Adame, A., and Masliah, E. (2015). A brain-targeted, modified neurosin (kallikrein-6) reduces α-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. Mol Neurodegener *10*.
- Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., de Calignon, A., Jones, P.B., and Hyman, B.T. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. Trends Neurosci. *32*, 150–159.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1999). Catalytic properties of the caspases. Cell Death Differ. 6, 1054–1059.
- Stennicke, H.R., Renatus, M., Meldal, M., and Salvesen, G.S. (2000). Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. Biochem. J. 350 Pt 2, 563– 568.
- Stennicke, H.R., Ryan, C.A., and Salvesen, G.S. (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. Trends Biochem. Sci. 27, 94–101.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 621–632.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., and Wong, W.W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. J. Biol. Chem. 272, 9677–9682.
- Tan, M.-S., Yu, J.-T., Jiang, T., Zhu, X.-C., and Tan, L. (2013). The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. 48, 875–882.
- Tan, X., Soualmia, F., Furio, L., Renard, J.-F., Kempen, I., Qin, L., Pagano, M., Pirotte, B., El Amri, C., Hovnanian, A., et al. (2015). Toward the first class of suicide inhibitors of kallikreins involved in skin diseases. J. Med. Chem. 58, 598–612.
- Tang, Y., Wells, J.A., and Arkin, M.R. (2011). Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis. J. Biol. Chem. 286, 34147–34154.
- Tashiro, A., and Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. Mol. Cell. Neurosci. *26*, 429–440.
- Tashiro, A., Minden, A., and Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. Cereb. Cortex *10*, 927–938.
- Tatebe, H., Watanabe, Y., Kasai, T., Mizuno, T., Nakagawa, M., Tanaka, M., and Tokuda, T. (2010). Extracellular neurosin degrades α-synuclein in cultured cells. Neurosci. Res. *67*, 341–346.
- Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E.L., Cameron, A.N., Das, S., Sena-Esteves, M., Hiltunen, M., Yang, S.-H., Zhong, Z., Shen, Y., et al. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. Neuron 54, 721–737.
- Thomas, C.N., Thompson, A.M., McCance, E., Berry, M., Logan, A., Blanch, R.J., and Ahmed, Z. (2018). Caspase-2 Mediates Site-Specific Retinal Ganglion Cell Death After Blunt Ocular Injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 59, 4453–4462.
- Thompson, R., Shah, R.B., Liu, P.H., Gupta, Y.K., Ando, K., Aggarwal, A.K., and Sidi, S. (2015). An Inhibitor of PIDDosome Formation. Mol. Cell *58*, 767–779.
- Thornberry, N.A. (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. Chem. Biol. 5, R97-103.

- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. Nature 356, 768–774.
- Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Zhao, J.J., Howard, A.D., Griffin, P.R., and Chapman, K.T. (1994). Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. Biochemistry *33*, 3934–3940.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. J. Biol. Chem. 272, 17907–17911.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. Science *304*, 843–846.
- Tinel, A., Janssens, S., Lippens, S., Cuenin, S., Logette, E., Jaccard, B., Quadroni, M., and Tschopp, J. (2007). Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-κB pathway. EMBO J *26*, 197–208.
- Titze-de-Almeida, R., David, C., and Titze-de-Almeida, S.S. (2017). The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. Pharm. Res. *34*, 1339–1363.
- Tiwari, M., Lopez-Cruzan, M., Morgan, W.W., and Herman, B. (2011). Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. J. Biol. Chem. *286*, 8493–8506.
- Tiwari, M., Sharma, L.K., Vanegas, D., Callaway, D.A., Bai, Y., Lechleiter, J.D., and Herman, B. (2014). A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2. Autophagy *10*, 1054–1070.
- Török, N.J., Higuchi, H., Bronk, S., and Gores, G.J. (2002). Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. Cancer Res. *62*, 1648–1653.
- Troy, C.M., and Jean, Y.Y. (2015). Caspases: Therapeutic Targets in Neurologic Disease. Neurotherapeutics *12*, 42–48.
- Troy, C.M., and Salvesen, G.S. (2002). Caspases on the brain. J. Neurosci. Res. 69, 145–150.
- Troy, C.M., and Shelanski, M.L. (2003). Caspase-2 redux. Cell Death Differ. 10, 101–107.
- Troy, C.M., and Shelanski, M.L. (2016). Caspase-2 and tau-a toxic partnership? Nat. Med. 22, 1207–1208.
- Troy, C.M., Stefanis, L., Greene, L.A., and Shelanski, M.L. (1997). Nedd2 is required for apoptosis after trophic factor withdrawal, but not superoxide dismutase (SOD1) downregulation, in sympathetic neurons and PC12 cells. J. Neurosci. *17*, 1911–1918.
- Troy, C.M., Rabacchi, S.A., Friedman, W.J., Frappier, T.F., Brown, K., and Shelanski, M.L. (2000). Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. J. Neurosci. 20, 1386–1392.
- Troy, C.M., Akpan, N., and Jean, Y.Y. (2011). Regulation of caspases in the nervous system implications for functions in health and disease. Prog Mol Biol Transl Sci *99*, 265–305.
- Truscott, M., Denault, J.-B., Goulet, B., Leduy, L., Salvesen, G.S., and Nepveu, A. (2007). Carboxyl-terminal proteolytic processing of CUX1 by a caspase enables transcriptional activation in proliferating cells. J. Biol. Chem. 282, 30216–30226.
- Tu, Y., Cheng, S., Zhang, S., Sun, H., and Xu, Z. (2013). Vincristine induces cell cycle arrest and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Int. J. Mol. Med. *31*, 113–119.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nat Rev Drug Discov 5, 785–799.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2012a). Protease signalling: the cutting edge. EMBO J. 31, 1630–1643.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012b). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. Biochim. Biophys. Acta *1824*, 68–88.
- Twiddy, D., and Cain, K. (2007). Caspase-9 cleavage, do you need it? Biochem J 405.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2006). Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. Oncogene *25*, 5683–5692.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Zhivotovsky, B. (2010). The unpredictable caspase-2: what can it do? Trends Cell Biol. 20, 150–159.
- Van Battum, E.Y., Brignani, S., and Pasterkamp, R.J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. Lancet Neurol 14, 532–546.
- Van Noorden, C.J. (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. Acta Histochem. 103, 241–251.
- Venderova, K., and Park, D.S. (2012). Programmed Cell Death in Parkinson's Disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2.
- Vigneswara, V., Berry, M., Logan, A., and Ahmed, Z. (2012). Pharmacological Inhibition of Caspase-2 Protects Axotomised Retinal Ganglion Cells from Apoptosis in Adult Rats. PLOS ONE 7, e53473.

- Vigneswara, V., Berry, M., Logan, A., and Ahmed, Z. (2013). Caspase-2 is upregulated after sciatic nerve transection and its inhibition protects dorsal root ganglion neurons from apoptosis after serum withdrawal. PLoS ONE *8*, e57861.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser,
 A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa.
 Science 302, 1036–1038.
- Viola, K.L., and Klein, W.L. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. Acta Neuropathol. *129*, 183–206.
- Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F.F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M.F., and Andersen, J.K. (2001). Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. J. Neurosci. *21*, 9519–9528.
- Walker, N.P.C., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenza, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1β-converting enzyme: A (p20/p10)2 homodimer. Cell *78*, 343–352.
- Wang, Y., and Gu, X. (2001). Functional divergence in the caspase gene family and altered functional constraints: statistical analysis and prediction. Genetics *158*, 1311–1320.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell *78*, 739–750.
- Wang, S., Miura, M., Jung, Y.K., Zhu, H., Li, E., and Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. Cell *92*, 501–509.
- Wang, Y., Chang, J., Liu, X., Zhang, X., Zhang, S., Zhang, X., Zhou, D., and Zheng, G. (2016). Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. Aging (Albany NY) 8, 2915–2926.
- Wang, Z., Watt, W., Brooks, N.A., Harris, M.S., Urban, J., Boatman, D., McMillan, M., Kahn, M., Heinrikson, R.L.,
 Finzel, B.C., et al. (2010). Kinetic and structural characterization of caspase-3 and caspase-8 inhibition by a novel class of irreversible inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 1804, 1817–1831.
- Warby, S.C., Doty, C.N., Graham, R.K., Carroll, J.B., Yang, Y.-Z., Singaraja, R.R., Overall, C.M., and Hayden, M.R. (2008). Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. Hum. Mol. Genet. 17, 2390–2404.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.-A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., et al. (2002). Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. J. Neurosci. 22, 7862–7872.
- Wen, X., Lin, Z.-Q., Liu, B., and Wei, Y.-Q. (2012). Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 45, 217–224.
- Westphal, D., Sytnyk, V., Schachner, M., and Leshchyns'ka, I. (2010). Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *285*, 42046–42057.
- Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., and Truman, J.W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. Nat. Neurosci. *9*, 1234–1236.
- Wilson, C.H., Shalini, S., Filipovska, A., Richman, T.R., Davies, S., Martin, S.D., McGee, S.L., Puccini, J., Nikolic, A., Dorstyn, L., et al. (2015). Age-related proteostasis and metabolic alterations in Caspase-2-deficient mice. Cell Death Dis 6, e1615.
- Wilson, C.H., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2016). Fat, sex and caspase-2. Cell Death Dis 7, e2125.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., and Raybuck, S.A. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature 370, 270–275.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nat. Immunol. *10*, 348–355.
- Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G.S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G.E., Paige, C.J., et al. (2003). Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. Nat. Immunol. 4, 1016–1022.
- Wouters, J., Huygens, M., Pochet, L., Pirotte, B., Durant, F., and Masereel, B. (2002). Structural approach of the mechanism of inhibition of alpha-chymotrypsin by coumarins. Bioorg. Med. Chem. Lett. *12*, 1109–1112.
- Yakovlev, A.G., and Faden, A.I. (2001). Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. Mol. Neurobiol. 24, 131–144.
- Yan, X.X., Najbauer, J., Woo, C.C., Dashtipour, K., Ribak, C.E., and Leon, M. (2001). Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. J. Comp. Neurol. 433, 4–22.

- Yang, Y.L., and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res. 10, 169–177.
- Yang, Y.-P., Liang, Z.-Q., Gu, Z.-L., and Qin, Z.-H. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. Acta Pharmacol. Sin. *26*, 1421–1434.
- Yin, X.-M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. Gene *369*, 7–19.
- Yoon, H., and Scarisbrick, I.A. (2016). Kallikrein-related peptidase 6 exacerbates disease in an autoimmune model of multiple sclerosis. Biol Chem *397*, 1277–1286.
- Yu, J.W., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2009). Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 8169–8174.
- Yuan, J., and Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. Nature 407, 802–809.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell *75*, 641–652.
- Zandy, A.J., Lakhani, S., Zheng, T., Flavell, R.A., and Bassnett, S. (2005). Role of the executioner caspases during lens development. J. Biol. Chem. *280*, 30263–30272.
- Zeng, C., Feng, Y., Wang, W., Zhou, F., Liao, F., Liu, Y., and Feng, S. (2018). The size-dependent apoptotic effect of titanium dioxide nanoparticles on endothelial cells by the intracellular pathway. Environ. Toxicol.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation. J Exp Med *193*, 247–254.
- Zhang, Y., Padalecki, S.S., Chaudhuri, A.R., De Waal, E., Goins, B.A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G.R., and Herman, B. (2007). Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. Mech. Ageing Dev. *128*, 213–221.
- Zhao, B., Mei, Y., Schipma, M.J., Roth, E.W., Bleher, R., Rappoport, J.Z., Wickrema, A., Yang, J., and Ji, P. (2016a). Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening. Dev. Cell *36*, 498–510.
- Zhao, X., Kotilinek, L.A., Smith, B., Hlynialuk, C., Zahs, K., Ramsden, M., Cleary, J., and Ashe, K.H. (2016b). Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. Nat. Med. 22, 1268–1276.
- Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. Molecular Neurodegeneration 1, 5.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., and Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. Cell Death Differ. *6*, 644–651.
- Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. Neuron 44, 749–757.

COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS

Brevet :

Novel compounds and their use as selective inhibitors of Caspase-2. Déposé le 25 Septembre 2017 EP17306270.4. Extension PCT/EP2018/076178.

Liste des publications :

<u>Elodie Bosc</u>, Julie Anastasie, Feryel Soualmia, Cynthia Lefebvre, Ségolène Pretat, Gullen Lacin, Eric Duplus, Philippe Tixador, Bernard Brugg, <u>Chahrazade El Amri</u>, and <u>Etienne Jacotot</u>. **Toward a selective irreversible Caspase-2 inhibitor**. (*Non soumis*)

Bosc, E., Nastri, J., Lefort, V., Valli, M., Contiguiba, F., Pioli, R., Furlan, M., Bolzani, V. da S., <u>El</u> <u>Amri, C.</u>, and Reboud-Ravaux, M. (2018). **Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome**. Biochem. Biophys. Res. Commun. *496*, 961–966.

Soualmia, F., <u>Bosc, E.</u>, Amiri, S.A., Stratmann, D., Magdolen, V., Darmoul, D., Reboud-Ravaux, M., and <u>El Amri, C.</u> (2018). **Insights into the activity control of the kallikrein-related peptidase 6: small-molecule modulators and allosterism**. Biol. Chem. *399*, 1073–1078.

Abderrazak, A., El Hadri, K., <u>Bosc, E.</u>, Blondeau, B., Slimane, M.-N., Büchele, B., Simmet, T., Couchie, D., and Rouis, M. (2016). **Inhibition of the Inflammasome NLRP3 by Arglabin Attenuates Inflammation, Protects Pancreatic β-Cells from Apoptosis, and Prevents Type 2 Diabetes Mellitus Development in ApoE2Ki Mice on a Chronic High-Fat Diet**. J. Pharmacol. Exp. Ther. *357*, 487–494.

Arama, D.P., Soualmia, F., Lisowski, V., Longevial, J.-F., <u>Bosc, E.</u>, Maillard, L.T., Martinez, J., Masurier, N., and <u>El Amri, C.</u> (2015). **Pyrido-imidazodiazepinones as a new class of reversible inhibitors of human kallikrein 7**. Eur J Med Chem *93*, 202–213.

Communications :

Soualmia, F., <u>Bosc, E.</u>, Amiri, S.A., Stratmann, D., Magdolen, V., Darmoul, D., Reboud-Ravaux, M., and <u>El Amri, C.</u> (2018). **Insights into the activity control of the kallikrein-related peptidase 6: small-molecule modulators and allosterism**. 8ème Colloque du Groupe « Protéolyse cellulaire » ; Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM). 15 - 17 Octobre **2018**. La Grande-Motte, France.

<u>Elodie Bosc</u>, Julie Anastasie, Feryel Soualmia, Cynthia Lefebvre, Ségolène Pretat, Gullen Lacin, Eric Duplus, Philippe Tixador, Bernard Brugg, <u>Chahrazade El Amri</u>, and <u>Etienne Jacotot</u>. **Toward a selective irreversible Caspase-2 inhibitor**. 24th Conference of the European Cell Death Organization, "Cell Death in Health and Disease". September 28th-30th **2016**. Barcelona, Spain.

<u>Elodie Bosc</u>, Julie Anastasie, Feryel Soualmia, Eric Duplus, Ségolène Prétat, Gullen Lacin, Philippe Tixador, Bernard Brugg, <u>Chahrazade El Amri</u>, and <u>Etienne Jacotot</u>. **Inhibiting preferentially Caspase-2 with a new irreversible pentapeptide derivate**. Colloque Enzymes et Biocatalyse ; Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM). 9 - 12 Mai **2017**. Croisic, France.

Resume

Les Caspases sont des endoprotéases à cystéine connues pour leurs rôles clé dans la régulation de l'apoptose et de l'inflammation. Parmi elles, la Caspase-2 (NEDD-2, ICH-1, CASP-2) est singulière de par ses multiples rôles dans le maintien de la stabilité génomique, la régulation du stress oxydant, la suppression de tumeur et également dans les processus neurodégénératifs aigus et chroniques. D'ailleurs, son rôle en tant qu'initiateur de la mort cellulaire a été démontré dans de nombreux modèles de stress neuronaux. Dans ce contexte, des études récentes ont contribué à la validation de la CASP-2 en tant que cible thérapeutique potentielle de la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, le développement d'inhibiteurs spécifiques constituerait des outils pharmacologiques qui permettraient de mieux appréhender les rôles de cette protéase dans la physiologie et pathologie du neurone. Les inhibiteurs de Caspases actuels sont majoritairement des séquences tétra ou pentapeptidiques qui reproduisent les motifs préférentiellement reconnus par les différents membres. Par exemple, la CASP-2 reconnait un motif pentapeptidique VDVAD qui est aussi reconnu par les CASP-3 et -7. Dans le cadre de ce travail de thèse, trois stratégies d'identification d'inhibiteurs ont été suivies ; (i) une approche de conception rationnelle de peptides inhibiteurs ciblant le site actif, (ii) conception in silico de peptides inhibiteurs de l'interface de dimérisation, (iii) criblage aléatoire et rationnel de petites molécules organiques. Parmi ces stratégies, l'inhibition du site actif s'est révélée être la plus fructueuse. Nous avons ainsi pu démontrer que des variations du résidu Alanine en P2 sur le motif initial VDVAD permettaient d'améliorer les paramètres de sélectivité et d'efficacité. Sur ce constat une série de peptides « LI » avec des mécanismes d'inhibition variés a été développée. Parmi eux, deux composés LJ2 et LJ3 ont démontré un excellent potentiel inactivateur de la CASP-2, tout en conservant un effet préférentiel sur cette dernière. Nous avons également montré que ces deux composés protègent de la perte synaptique induite par des oligomères A β_{1-42} dans des réseaux de neurones reconstruits in vitro. Ces travaux de thèse ouvrent donc le champ à de nouvelles perspectives sur le plan fonctionnel, notamment pour le développement de sondes d'activités spécifiques, inexistantes actuellement, ainsi que sur le plan thérapeutique.

<u>Mots-clés</u>: Caspase-2; peptides inhibiteurs; conception rationnelle; inactivateurs sélectifs; maladie d'Alzheimer; réseaux neuronaux

Abstract

Caspases are cysteine endoproteases known for their key roles in regulation of apoptosis and inflammation. Among them, Caspase-2 (NEDD, ICH-1, CASP-2) is unique with roles in maintaining genomic stability, regulating oxidative stress, tumor suppression and also in severe and chronic neurodegenerative processes. Moreover, its role as an initiator of death has been demonstrated in many models of neuronal stress. Recent studies have indicated that CASP-2 is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. It is therefore necessary to develop specific inhibitors which would constitute pharmacological tools to better understand the role of this protease in the physiology and pathology of the neuron. The current Caspases inhibitors are mostly tetra or pentapeptide sequences that reproduce the patterns preferentially recognized by the targeted Caspases. For example, CASP-2 recognize a VDVAD pattern but this pattern is also recognized by CASP-3 and -7. During this thesis project, we used three identification strategies; (i) a rational design approach of inhibiting peptides targeting the active site, (ii) in silico design of inhibiting peptides of the dimerization interface, (iii) rational an random screening of small organic molecules. Among these strategies, inhibition of the active site has been shown to be the most productive one. We have been able to demonstrate that the variation of the Alanine residue in P2 on the initial pattern VDVAD increased the efficiency and selectivity parameters. Based on this observation, a serie of peptides "LI" with various inhibitory mechanisms has been developed. Among them, two compounds LJ2 and LJ3 demonstrated an excellent inactivation of the CASP-2, while maintaining a selective effect in favor of this enzyme. We have also shown that these two compounds protect against synapse loss induced by the peptide AB 1-42 in neuron networks reconstructed *in vitro*. This thesis project opens the field to new perspectives on the functional level for the development of specific activity probes, which currently do not exist, as well as on the therapeutic plan.

<u>*Keywords*</u>: Caspase-2; peptide inhibitors, rational design; selective inactivators; Alzheimer's disease; neuronal networks