Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation

Marielle Wandhammer

▶ **To cite this version:**

Marielle Wandhammer. Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF017 . tel-00763306

HAL Id: tel-00763306
https://theses.hal.science/tel-00763306

Submitted on 10 Dec 2012

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

EDSC
Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

- UMR 7199

THÈSE

présentée par

Marielle WANDHAMMER

soutenue le **16 février 2012**

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Sciences Chimiques

Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés
—
Stratégie de réactivation

THÈSE dirigée par :

Mr GOELDNER Maurice	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr RENARD Pierre-Yves	Professeur, Université de Rouen
Mr WEIK Martin	Directeur de Recherche, IBS Grenoble

MEMBRES DU JURY :

Mme SABATIER Laurence	Professeur, Université de Strasbourg
Mr RENARD Pierre-Yves	Professeur, Université de Rouen
Mr WEIK Martin	Directeur de Recherche, IBS Grenoble
Mr GOELDNER Maurice	Professeur, Université de Strasbourg
Mr NACHON Florian	Ingénieur Divisionnaire d'Etudes et de Fabrication, IRBA-CRSSA

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés en collaboration entre le Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives dans l'équipe de « Chimie Bioorganique » du Professeur Maurice Goeldner et à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées dans l'unité d'Enzymologie du Docteur Florian Nachon et financés par la Defence Threat Reduction Agency, département de la défense américaine.

Je tiens tout d'abord à remercier,
Pr **Maurice Goeldner**, de l'Université de Strasbourg, directeur de cette thèse, pour m'avoir fait confiance durant ces trois années, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir fait le pari de me confier ce sujet aussi passionnant qu'audacieux.
Dr **Florian Nachon**, Ingénieur Divisionnaire d'Etudes et de Fabrication à l'IRBA-CRSSA, pour m'avoir encadrée, conseillée et soutenue tous les jours, et surtout de m'avoir laissée cette autonomie sans qui je n'aurais jamais appris autant.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail, Pr **Laurence Sabatier**, de l'Université de Strasbourg, Pr **Pierre-Yves Renard**, de l'Université de Rouen et Dr **Martin Weik**, Directeur de Recherche à l'IBS. Mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Mes remerciements s'adressent également
à **Daan Noort** et **Martijn de Koning**, collaborateurs du TNO sur ce projet. Leur participation m'a fourni matière à de longues réflexions et expériences.
à **Alexandre Specht**, qui m'a encadrée et fait découvrir la chimie organique et notamment la « chimie du pneu ». Bravo à toi d'avoir réussi l'impensable….
ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire et celle du « labo d'en face », **Thomas**, **Sophie**, **Tian**, **Damien**, **Adeline**, **Séb**, **Antoine**, **les deux David**, **Portia**, **Loïc**, **Nathalie**, **Gaëlle**, **Mélanie**, **Aïcha** et tous les autres, pour m'avoir accueillie aussi chaleureusement lors de mes passages en Alsace, et m'avoir fourni toute l'aide dont j'ai eu besoin.
à tous ceux qui ont partagé mon quotidien au département de Toxicologie, **Marie-Thé**, **Marie**, **Xavier**, **Frédérique**, **Emilie, Guilhem, Mélanie A.** pour leur aide et leur soutien,
et les autres, **Virginie**, **Le Doc**, **Tom**, **Sandrine**, **Chantal**, **Cathy**, **Véro** et tous ceux que j'oublie, pour les bons moments passés en votre compagnie.
un merci particulier à **Mélanie T.L.** et **Eugénie** pour m'avoir aidée, tant dans mon travail que dans le reste, et sans qui certains moments auraient été difficiles.
Je remercie également toute ma famille et mes amis qui ont été là, chaque moment et qui ont, à leur façon, contribué à ce travail. Je pense à ma maman, mon frère, Nana, mon papa, Sylvie, Jean-Claude, Sabrina, et les autres…..
Enfin, je dédie ces trois années de travail à **Arnaud** qui m'a soutenue sans faille et à **Baptiste**.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS……**1**

INTRODUCTION GENERALE……**7**

CHAPITRE 1 : L'inhibition des cholinestérases……**11**
L'intoxication par les composés organophosphorés……**13**
1. Les différentes classes d'organophosphorés……**13**
1-1. Les pesticides organophosphorés
1-2. Les neurotoxiques de guerre
1-2-1. L'historique de l'utilisation des gaz toxiques
1-2-2. Le développement des neurotoxiques organophosphorés
1-2-3. Les propriétés physico-chimiques des neurotoxiques organophosphorés
1-3. Les médicaments
1-3-1. Le traitement du glaucome
1-3-2. Le traitement de la maladie d'Alzheimer

2. Le mécanisme d'action des toxiques organophosphorés……**20**
2-1. La cible: les cholinestérases
2-1-1. Le rôle catalytique de l'acétylcholinestérase
2-1-1-1. Le mécanisme de transmission de l'influx nerveux dans une synapse cholinergique
2-1-1-2. La régulation de la transmission de l'influx nerveux
2-1-2. Les rôles non catalytiques de l'acétylcholinestérase
2-1-2-1. L'adhésion cellulaire
2-1-2-2. L'assemblage des plaques d'amyloïde
2-1-2-3. La neuritogenèse
2-1-2-4. L'hématopoïèse et la thrombopoïèse
2-1-3. Le rôle de la butyrylcholinestérase
2-1-4. La structure des cholinestérases
2-1-4-1. La structure quaternaire
2-1-4-2. L'organisation structurale liée à la fonction catalytique
2-2. Le mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés
2-3. Les autres enzymes interagissant avec les organophosphorés

3. Les effets d'une intoxication aux organophosphorés……**39**

Les moyens de défense contre la menace des OP……**41**
1. Pré-traitements actuels……**41**

2. Traitements actuels……**42**
2-1. La décontamination
2-2. Les traitements symptomatiques
2-3 Les traitements spécifiques
2-4. Le développement des oximes
2-4-1. Le mécanisme d'action des oximes
2-4-2. Les limites imputées oximes
2-4-2-1. Limites dans le choix du modèle d'étude
2-4-2-2. Limites d'action

2-4-2-3. Le tabun
2-4-2-4. Le vieillissement de l'acétylcholinestérase

Les stratégies thérapeutiques enzymatiques **54**
1. La butyrylcholinestérase humaine et ses mutants **55**
2. L'acétylcholinestérase humaine et ses mutant **57**
3. La phosphotriestérase bactérienne **58**
4. La paraoxonase humaine **60**

CHAPITRE 2 : Nouveaux réactivateurs de l'hAChE vieillie **63**
Contexte **65**

Modélisation moléculaire **67**
1. Docking moléculaire **67**
1-1. Généralités
1-1-1 L'algorithme de recherche
1-1-2. La fonction dévaluation
1-2. Expérimentation

2. Préparation des ligands candidats **70**
2-1. Choix de la fonction électrophile alkylante
2-1-1. Généralités
2-1-2. Efficacité d'agents alkylants commerciaux …..
2-1-2-1 … sur un modèle simple
2-1-2-2 … sur un modèle peptidique
2-2. Choix du squelette
2-3. Construction de la bibliothèque de ligands

3. Préparation du récepteur = l'hAChE **80**

4. Résultats **84**
4-1. Validation des conditions d'analyses
4-1-1. Le choix du récepteur
4-1-2. La conservation du réseau de molécules d'eau
4-2. Les ligands basés sur un noyau chloroquinoline
4-2-1. La validité du modèle
4-2-2. Les réactivateurs bifonctionnels à noyau chloroquinoline
4-2-3. Les agents alkylants à noyau chloroquinoline
4-3. Les ligands basés sur un noyau pyridinium
4-3-1. Les réactivateurs bifonctionnels à noyau pyridinium/pyridine
4-3-1-1. …. en fonction du noyau
4-3-1-2. …. en fonction de la position de la chaine réactive sur le noyau
4-3-1-3. …. en fonction du groupement masquant la fonction oxime
4-3-2. Les agents alkylants à noyau pyridinium
4-3-2-1. …. portant une fonction trichloroacétimidate
4-3-2-2. …. portant une fonction bromoacétyle
5. Conclusions **102**
5-1. Les ligands basés sur un noyau chloroquinoline
5-2. Les ligands basés sur un noyau pyridinium

Chimie **104**
1. Synthèse du « 2-méthyl aldoxime HQ » **105**
2. Synthèse du « 2-carbaldéhyde oxime-AQ » **109**
3. Synthèse du « 2-bromoacétyl-AQ » **112**

Evaluation de l'activité biologique **115**
1. *Préliminaire* **115**
1-1. Modèle cinétique de l'hAChE
1-2. Mesure de l'activité cholinestérasique
1-3. Inhibition de l'hAChE par le VX

2. Evaluation de l'affinité des ligands synthétisés **119**
2-1. Les ligands basés sur le noyau chloroquinoline
2-1-1. Ligand n°22 : 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime
2-1-1-1. Mesure de la Concentration Inhibitrice à 50 % (IC_{50})
2-1-1-2. Mesure de la Constante d'Inhibition (Ki)
2-1-2. Ligand n°01 : 4-amino-7-chloroquinoline-2-carbaldéhyde oxime
2-1-2-1. Caractérisation par mesure du pKa
2-1-2-2. Mesure de la Constante d'inhibition (Ki)
2-2. Les ligands basés sur le noyau pyridinium
2-2-1. Caractérisation de l'affinité
2-2-2. Conclusions

3. Evaluation de la réactivité des ligands synthétisés **129**
3-1. Le ligand n°01, une nouvelle oxime ?
3-1-1. Réactivation de l'hAChE inhibée par le VX
3-1-2. Effet du pH sur la réactivation
3-2. Les réactivateurs bifonctionnels et agents alkylants
3-2-1. Ligand n°22 : 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime
3-2-2. Les ligands basés sur le noyau pyridinium

4. . Mise au point préliminaire d'une méthode de mesure d'affinité vis à vis de l'hAChE vieillie par thermofluorescence **134**
4-1. Méthode de « fluorescence-based thermal shift assay »
4-1-1. Principe
4-1-2. Application aux interactions protéine-ligand
4-2. Méthodologie
4-3. Résultats
4-3-1. L'hAChE native
4-3-2. Effet de l'huperzine A sur l'hAChE native
4-3-3. L'hAChE vieillie par le soman
4-3-3-1. Contrôle de l 'effet de l'isopropanol
4-3-3-2. Effet du vieillissement par le soman
4-3-4. Effet du 2PAM et du HI6 sur l'hAChE
4-3-5. Effet du ligand n°22 sur l'hAChE
4-4. Discussion

5. Conclusion **145**

Etudes cristallographiques **146**
1. Généralités **146**
2. Principe **146**
2-1. La cristallogenèse
2-2. La diffraction aux rayons X
2-3. Le traitement des données
2-4. L'affinement de la structure

3. Expérimentation **158**
3-1. Etude cristallographique dans l'acétylcholinestérase humaine (hAChE)
3-2. Etude cristallographique dans l'acétylcholinestérase de souris (mAChE)
3-3. Etude cristallographique dans la butyrylcholinestérase humaine (BChE)
3-3-1. Structure BChE-soman vieillie en complexe avec le ligand n°113
3-3-2. Structure BChE-soman vieillie en complexe avec le ligand n°318

4. Discussion et perspectives **176**

Discussion et perspectives générales **180**

CHAPITRE 3 : Etude structurale de l'énantiosélectivité de la BChE humaine **185**
Contexte de l'étude **187**

Résultats **190**
1. Inhibition de la BChE par les agents V **190**

*Publication 1 : « **Structural study of the complex stereoselectivity of human butyrylcholinesterase for the neurotoxic V-agents*** »

2. Inhibition du mutant G117H de la BChE par le VX **191**
Publication 2 : « **X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in the G117H mutant of human butyrylcholinesterase, a nerve agent target engineered into a catalytic bioscavenger** »

3. Inhibition de la BChE par le sarin **192**
3-1. Présentation de l'étude
3-2. Résultats

Discussion et perspectives **195**

PARTIE EXPERIMENTALE **201**

BIBLIOGRAPHIE **227**

ABREVIATIONS

2-PAM : 2-pyridine aldoxime methiodide

ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholinestérase
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
ADN : acide désoxyribonucléique
Ala (A) : alanine
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APP : Amyloïd Precursor Protein
Arg (R) : arginine
Asn (N) : asparagine
ATC : acétylthiocholine

BCh : butyrylcholine
BChE : butyrylcholinestérase (sous-entendu humaine)
BHE : barrière hémato-encéphalique
Bicine : N,N-bis(2-hydroxyéthyl)glycine
BOC : butoxycarbonyle
BSA : Bovine Serum Albumine

CAT : choline acétyltransférase
CBDP : 2-(ortho-crésyl)-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphoran-2-one
ChE : cholinestérase
CHO : Chinese Hamster Ovary
ColQ : cholinesterase-associated collagen Q
Cys (C) : cystéine

Da : Dalton
DFP : diisopropyl phosphorofluoridate
DiBAL : diisobutylaluminium
DiPEA : diisopropyléthylamine
DMAP : diméthylaminopyridine
DL_{50} : dose létale 50%
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxide
DO : densité optique
DTNB : acide 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoique)

ENU : N-nitroso-N-éthylurée
ESI : ElectroSpray Ionization
ESRF : European Synchrotron Radiation Facility
Et_2O : éther

FMO : flavine monooxygénases

GA : tabun
GABA : acide γ-aminobutyrique
GB : sarin
GD : soman
GDP : guanosine diphosphate
Gln (Q) : glutamine
Glu (E) : acide glutamique
Gly (G) : glycine
GPI : glycophosphatidylinositol
GTP : guanosine triphosphate

hAChE : acétylcholinestérase humaine
HDL : High Density Lipoprotein
HI-6 : dichlorure de 1-[4-(aminocarbonyl)pyridinio- méthoxy-méthyl]-2-[(hydroxyimino) méthyl] pyridinium monohydraté
HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
His (H) : histidine
HLö-7 : sulfonate de 1-[4-(aminocarbonyl) pyridinio- méthoxy-méthyl]-2,4-bis- [(hydroxyimino) méthyl] pyridinium diméthane
HPLC : High Performance Liquid Chromatography – Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

IC_{50} : concentration à 50 % inhibition
Ile (I) : isoleucine
ITC : Isothermal Titration Calorimetry - Calorimétrie de Titration Isotherme
iPrOH : isopropanol

Leu (L) : leucine
Lys (K) : lysine

***m*AChE** : acétylcholinestérase de souris
MeOH : méthanol

MES : acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique
Met (M) : méthionine
MMB-4 : dibromure de 1,10 - méthylène-bis[4-(hydroxyimino)méthyl] pyridinium
MNU : N-nitroso-N-méthylurée
MPEG : méthoxy-polyéthylène glycol

NMDA : N-méthyl D-aspartate
NTE : Neuropathy Target Esterase

Obidoxime : dichlorure de 1,1'-(oxybis-méthylène) bis[4-(hydroxyimino) méthyl] pyridinium
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OP : organophosphoré
OTMA : 4-oxo-N,N,N-triméthylpentanaminium

P.D : produit de départ
PA : potentiel d'action
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDB : Protein Data Bank
PEG : polyéthylène glycol
Phe (F) : phénylalanine
PON : paraoxonase
PTE : phosphotriestérase
PRAD : Proline Rich Attachment Domain
PRIMA : Proline-RIch Membrane Anchor
Pro (P) : proline
PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
R_f : facteur de rétention

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RT : room temperature

Ser (S) : sérine
SN_2 : substitution nucléophile type 2
SNC : système nerveux central

$t_{1/2}$: temps de demi-vie
TA : température ambiante
TcAChE : acétylcholinestérase de torpille californienne
TEPP : tétraéthyl-pyrophosphate
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofuranne
Thr (T) : thréonine
TLC : Thin Layer Chromatography
Tf : température de fusion
TMB-4 : dibromure de 1,3-triméthylène-bis(4-hydroxyiminométhylpyridinium)
TMS : triméthylsilyle
TMTFA : m-(N,N,N-triméthylammonio)- 2,2,2-trifluoroacétophénone
TNB : thionitrobenzoate
TNO : The Netherland Organization
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trp (W) : tryptophane
Tyr (Y) : tyrosine

Val : valine

WAT : tryptophan amphiphilic tetramerization

INTRODUCTION GENERALE

Dans le contexte militaire et politique actuel, les armes chimiques de guerre apparaissent comme une menace concrète et sérieuse, et ce malgré la Convention d'Interdiction des Armes chimiques signée en 1993 et ratifiée par 181 états. L'emploi de composés organophosphorés neurotoxiques (OP) a, par le passé, entrainé des dommages importants, tant lors de conflits militaires comme dans la guerre Iran-Irak (1980-1988) ou la guerre du Golfe (1991) que dans les milieux civils comme l'attentat dans le métro de Tokyo (1995). Parallèlement, le contexte socio-économique tend vers une accélération des moyens de production, notamment dans le domaine agricole. L'utilisation de pesticides organophosphorés, bien que réglementée, provoque des intoxications accidentelles non négligeables. Ainsi, le développement de moyens de protection contre ces neurotoxiques semble tout à fait justifié.

La cible physiologique de ces neurotoxiques organophosphorés, l'acétylcholinestérase, est une enzyme qui permet la transmission de l'influx nerveux au niveau central et périphérique. Son inhibition par les OP peut entrainer la mort par arrêt cardio-respiratoire. Des moyens de décontamination, de protection ou encore des traitements existent mais restent limités tant dans leur efficacité que dans leur spectre d'action. Ainsi, les objectifs de recherche dans ce domaine tendent à l'amélioration de ces moyens par la compréhension des mécanismes d'action permettant la conception de nouvelles molécules plus efficaces.

Plusieurs projets développés au département de Toxicologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées sont axés autour de ces thématiques : compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'inhibition, conception de nouvelles molécules capables de réactiver les cholinestérases inhibées, développement de bioépurateurs enzymatiques capables de détoxifier le plasma avant que le neurotoxique atteigne sa cible. Ces projets sont développés en collaboration avec des équipes universitaires françaises, étrangères ainsi que les Instituts de recherche de plusieurs pays (Allemagne, Pays-Bas, République Tchèque...), spécialisés dans la défense contre les armes chimiques.

Mon travail s'inscrit dans ce cadre puisqu'il a consisté, d'une part, à réaliser plusieurs études structurales sur la butyrylcholinestérase humaine (BChE), bioépurateur enzymatique prometteur, en vue de comprendre certains mécanismes d'inhibition et de mettre en évidence l'action de certaines molécules vis à vis de cette enzyme et d'autre part, à concevoir de nouveaux réactivateurs de l'acétylcholinestérase vieillie, une évolution de l'enzyme inhibée vers une forme non réactivable par les antidotes connus. A partir d'informations obtenues par modélisation moléculaire, nous avons synthétisé et testé *in vitro* des molécules candidates à la réactivation des enzymes vieillies.

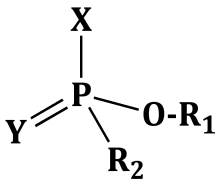
Une étude bibliographique exposant le contexte de notre travail précédera la description des résultats de nos différents thèmes de travail ainsi que les conclusions et les perspectives associées.

CHAPITRE 1 :

L'inhibition des cholinestérases

L'INTOXICATION PAR LES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES

Les composés organophosphorés (OP) sont constitués d'un atome de phosphore pentavalent, lié à quatre substituants : un atome d'oxygène ou de soufre via une double liaison, un groupe partant (X), un groupement alkoxyle (O-R_1) et un autre groupement (R_2), selon la structure générale suivante :



Y = O ou S
X = CN, F, alkoxyle, thioalkyle
R1 = alkyle
R2 = alkyle, aryle, alkoxyle, thioalkyle

Parmi ces composés organophosphorés, on retrouve différentes classes, les pesticides, les neurotoxiques de guerre et les médicaments.

1. Les différentes classes d'organophosphorés

1-1. Les pesticides organophosphorés

Ces esters et amides d'acides (thio)phosphorique ou (thio)phosphonique, dont les noms de matières actives sont le plus souvent identifiables par leur terminaison en "phos" ou en "thion", appartiennent à la famille des anticholinestérasiques.

En 1854, le chimiste français P. de Clermont décrit, pour la première fois, la synthèse du tétraéthyl-pyrophosphate (TEPP), qui deviendra, en 1944, le premier pesticide organophosphoré commercialisé en Allemagne. Les progrès des pratiques agricoles et des connaissances scientifiques amènent à la découverte du parathion, par le chimiste allemand G. Schrader, également en 1944. Du fait de sa forte toxicité tant pour les animaux que pour les insectes, de nombreux autres pesticides, moins toxiques, verront le jour à partir des années 50. Dans les années 1970, l'interdiction de l'utilisation des pesticides organochlorés a favorisé la diffusion des organophosphorés, plus efficaces mais moins persistants.

Employés essentiellement comme insecticides ou acaricides, leur forte toxicité a entraîné leur substitution par les carbamates et les pyréthrinoïdes. Selon la classification publiée en 2010 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), presque la moitié des pesticides appartenant aux deux classes les plus dangereuses (Ia et Ib) sont des organophosphorés (tableau 1).

Classe		DL_{50} (rat) (mg/kg)		OP sur pesticides recensés	Exemple
		oral	cutanée		
Ia	Extrêmement dangereux	< 5	< 50	13 sur 28	Parathion
Ib	Hautement dangereux	5 à 50	50 à 200	23 sur 58	Dichlorvos
II	Moyennement dangereux	50 à 2000	200 à 2000	25 sur 215	Diazinon
III	Faiblement dangereux	> 2000	> 2000	5 sur 104	Malathion
U	Sans danger apparent	> 5000		0 sur 179	

Tableau 1 : Classification recommandée par l'OMS des pesticides en fonction de leur dangerosité, le nombre et des exemples qui leur sont associés.

Selon le règlement CE 1107/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, 9 pesticides organophosphorés restent autorisés par l'Union Européenne dont le fenamiphos (classe Ia) et l'éthoprophos (classe Ib). Malgré la réglementation prise par certains pays, les intoxications, accidentelles ou volontaires, sont fréquentes, particulièrement en Asie, avec une fréquence approchant les 3 millions d'intoxications par an dans le monde entier (Worek, Koller *et al.* 2005 ; Eddleston, Buckley *et al.* 2008) et une mortalité de l'ordre de 200 000 personnes par an (Eddleston, Dawson *et al.* 2004). Après leur absorption, les pesticides organophosphorés vont subir différents types de biotransformation selon leur nature, conduisant à leur élimination plus ou moins rapide. Les réactions d'oxydation s'effectuent grâce à des systèmes enzymatiques microsomaux (oxygénases à cytochrome P450 et monooxygénases à flavine (FMO)) (Dauterman 1971 ; Hajjar and Hodgson 1980). Ce métabolisme oxydatif peut conduire à la formation de métabolites plus toxiques que la molécule-mère (Fukuto 1990). C'est le cas du parathion-éthyl qui, par désulfuration, devient le paraoxon, lui-même toxique pour l'organisme (schéma 2).

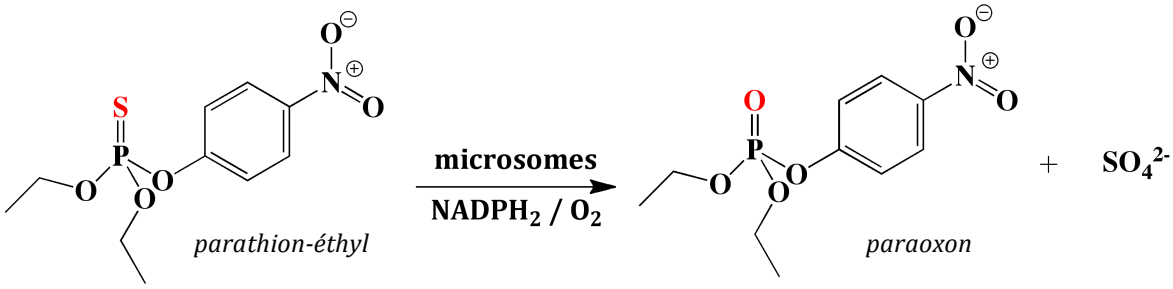


Schéma 2 : Métabolisme oxydatif du parathion-éthyl en paraoxon

Les réactions d'hydrolyse, quant à elles, permettent une réelle détoxication en donnant naissance à des métabolites bien moins toxiques. Ces hydrolases peuvent être des estérases ou des amidases et sont distribuées dans différents organes et tissus (foie, plasma, tube digestif) (Dauterman 1971).

1-2. Les neurotoxiques de guerre

Les armes chimiques regroupent un très grand nombre de toxiques dont la classification peut être variable. Si on choisit leur mode d'action, trois grandes catégories se distinguent :

- les **suffocants** agissent au niveau des voies respiratoires. Le chlore ou le phosgène ont été employés de manière intensive lors de la Première Guerre Mondiale. Malgré leur facilité de fabrication et leur faible coût, ils ont perdu de leur intérêt du fait de leur toxicité inférieure à celle des agents modernes.

- les **vésicants** entraînent des lésions sur la peau et les muqueuses de type brûlure. Ils sont très persistants, leur décontamination et leur thérapeutique sont médiocres. L'ypérite est le chef de file de cette classe.

- les **neurotoxiques organophosphorés**, quant à eux, comme leur nom l'indique, visent le système nerveux. Leurs caractéristiques les rendent particulièrement redoutables, au delà de leur toxicité pure.

1-2-1. Historique sur l'utilisation des gaz toxiques

Lors de la Première Guerre mondiale, l'attaque d'Ypres, le 22 avril 1915, a marqué le début de la guerre chimique moderne. Contournant la Convention de la Haye de 1899 visant à interdire les « *projectiles spécialement conçus pour la dispersion des toxiques* », le chimiste allemand Fritz Haber eut l'idée de placer du chlore dans des

cylindres d'acier. Ces bouteilles, installées sur 6 kilomètres de lignes allemandes, furent ouvertes simultanément, laissant se disperser au gré du vent, 150 à 180 tonnes de chlore (figure 3) (Meyer, 2001, *L'arme chimique*, Ellipses Marketing).

Figure 3 : Vue aérienne de la dispersion par le vent du chlore contenu dans des bouteilles en acier, Première Guerre Mondiale (source : « Collier's New Photographic History of the World's War » - New York, 1918).

Le développement des agents utilisés et des procédés de mise en place conduisirent à l'utilisation du phosgène par les troupes françaises à Verdun en mars 1916. Puis les mortiers et les canons substituèrent les moyens rudimentaires d'émissions de gaz, trop dépendants des conditions météorologiques. En juillet 1917, les britanniques lancèrent les premiers obus contenant de l'ypérite, nommée aussi « gaz moutarde », du fait de son odeur caractéristique. L'utilisation de l'ypérite se développa rapidement du fait du caractère spectaculaire et incapacitant des lésions engendrées (brûlures des yeux et des voies respiratoires). Ainsi, la Première Guerre Mondiale fut témoin de l'utilisation de près de 113 000 tonnes de toxiques de guerre, tuant ou blessant plus d'un million de personnes soit environ 5 % du bilan global, toutes causes confondues.

Au cours des années qui suivirent, l'emploi d'armes chimiques dans différents théâtres d'opérations militaires eurent lieu mais restèrent assez rares. Parallèlement, des négociations, quant à l'interdiction « *de l'emploi à la guerre de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires ainsi que tout liquide, matière ou procédé analogue, à juste titre condamné par l'opinion générale du monde civilisé* », se concrétisèrent par la signature, le 17 juin 1925, du **Protocole de Genève**. Cette

interdiction ne visant que l'emploi, de nombreuses nations poursuivirent la recherche et le développement de nouvelles armes chimiques.

1-2-2. Le développement des neurotoxiques organophosphorés

Issus de la recherche sur les insecticides, c'est dans la deuxième moitié des années 30 que les chimistes allemands ont mis au point la synthèse du **tabun** ou GA (1936), suivi du **sarin** ou GB (1937) puis du **soman** ou GD (1944). Aux agents G pour « German » a suivi la synthèse du **VX** par les Britanniques en 1953 à partir d'un insecticide, le Tétram. Malgré leurs caractéristiques opérationnelles qui en font des armes redoutables, la crainte des évènements du passé et des représailles à l'identique par l'ennemi a provoqué une abstention de leur utilisation pendant la Seconde Guerre Mondiale, sauf en Extrême-Orient entre 1937 et 1941. Néanmoins, dès 1983, lors du conflit Irak-Iran, les irakiens utilisèrent l'ypérite, le sarin et le tabun contre les troupes iraniennes mais également contre les populations civiles, et plus particulièrement kurdes. Ce fut le cas lors du tristement célèbre massacre de Halabja, le 17 mars 1988 (Macilwain 1993). Le sarin fut également mis en avant lors d'actes terroristes, notamment, dans le métro de Tokyo, le 20 mars 1995, perpétrés par la secte Aum Shinrikyo. Lors de cet attentat, le bilan a fait état de 11 morts, 70 intoxiqués graves et plus de 5 000 blessés légers.

Aujourd'hui, la **Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques**, signée le 13 janvier 1993, vise à interdire la mise au point, la fabrication, le stockage et l'usage des armes chimiques et à détruire les stocks existants. Selon l'Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques (OPWC), sur 195 Etats, 190 l'ont signée mais 4 ne l'ont pas encore ratifiée. Seuls l'Angola, la Corée du Nord, l'Egypte, la Somalie et la Syrie demeurent en dehors de la Convention.

1-2-3. Les propriétés physico-chimiques des neurotoxiques organophosphorés

Il existe donc deux grandes classes de neurotoxiques organophosphorés, les **agents G** et les **agents V** (tableau 4), possédant des caractéristiques communes. Ces produits sont insidieux, stables, résistants à la dispersion et faciles d'utilisation.

Propriétés	**Agents G**	**Agents V**
Volatilité	+++	+
Persistance	+	+++
Pénétration : respiratoire	+++	++
cutanée	+	+++
Moyen de dispersion	aérosols	aérosols

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des agents G et V. (+ : peu ; ++ : moyennement ; +++ : très).

Ainsi, les agents V sont plus toxiques que les agents G (tableau 5).

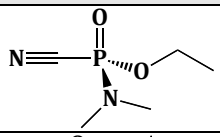
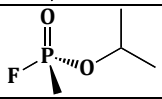
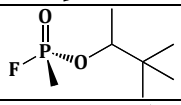
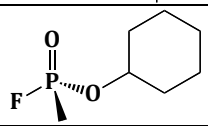
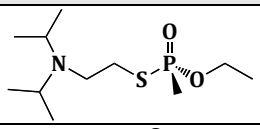
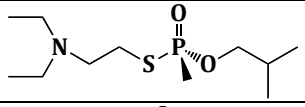
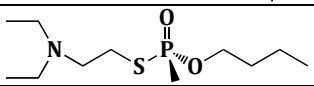
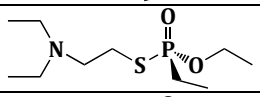
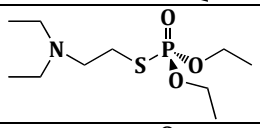
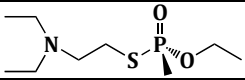
Agents G	Structure	DL_{50} (mg/kg)	LCt_{50} ($mg.m^{-3}/min$)
GA (tabun)		23	100-200
GB (sarin)		28	70-100
GD (soman)		18	70
GF (cyclosarin)		0.35	n.c
Agents V			
VX		0.14	30-50
VR		n.c	10-50
CVX		n.c	n.c
VE		n.c	n.c
VG (Tétram)		n.c	100-500
VM		n.c	10-50

Tableau 5 : Dénomination, structure et létalité des principaux neurotoxiques organophosphorés. La DL_{50} (Dose Létale 50 %) estime la dose entraînant 50 % de décès après intoxication percutanée chez l'Homme. La LCt_{50} estime la létalité après intoxication par inhalation chez l'Homme, en fonction du temps. (n.c : non communiqué) (Source : Federation of American Scientists et www.cbwinfo.com)

1-3. Les médicaments

Comme tous les composés organophosphorés, les médicaments organophosphorés agissent en tant qu'inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase (cf. chapitre 1, paragraphe « *Le mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés* », page 35). Cette irréversibilité entraîne des effets secondaires plus ou moins incommodants.

1-3-1. Le traitement du glaucome

Le glaucome est une maladie dégénérative du nerf optique, associée, le plus souvent, à une pression intraoculaire élevée comprimant et endommageant le nerf optique et la rétine. La perte de vision occasionnée est permanente et irréversible. La pression intraoculaire est fonction du volume d'humeur aqueuse contenue dans l'œil. L'**échothiophate** (Iodure de Phospholine®) tend à réduire la sécrétion d'humeur aqueuse (Reichert and Shields 1991) et le **diisopropyl fluorophosphate** ou **DFP** (Fluostigmine®) agit comme agent myotique, en augmentant l'élimination de l'humeur aqueuse (Quilliam 1947). Ces deux composés organophosphorés restent potentiellement toxiques si les quantités administrées sont trop importantes (Manoguerra, Whitney *et al.* 1995 ; Mezer, Krivoy *et al.* 1996).

1-3-2. Le traitement de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, décrite en 1907, est une maladie neurodégénérative progressive. L'atteinte précoce des neurones de l'hippocampe entraine en premier lieu, des troubles de la mémoire. S'y ajoutent, ensuite, une perturbation des fonctions cognitives (langage, raisonnement, orientation,…), par extension aux aires associatives du néocortex, et des troubles du comportement (figure 6).

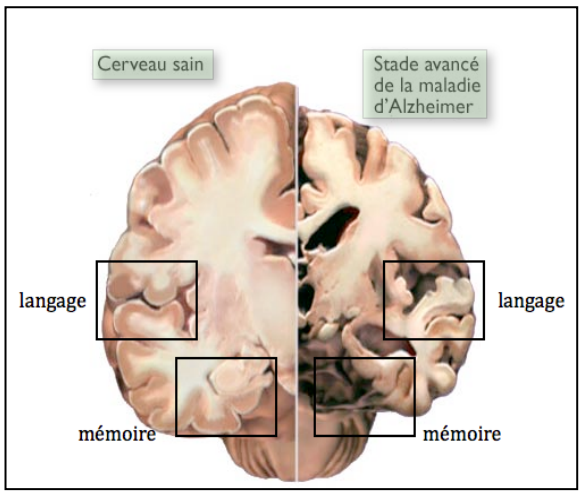


Figure 6 : Comparaison de coupe d'un cerveau sain à un cerveau en stade avancé de la maladie d'Alzheimer. (source : www.alz.org, Stacy Janis)

Au niveau cellulaire et moléculaire, des lésions cérébrales caractérisent cette dégénérescence, les plaques amyloïdes et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire. Le système cholinergique est le plus précocement atteint avec une synthèse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) anormalement basse. Un des traitements de cette maladie est de pallier le déficit en ACh en inhibant sa dégradation au niveau de la fente synaptique, c'est-à-dire en inhibant l'acétylcholinestérase. Les molécules à la base de ce traitement symptomatique sont des inhibiteurs réversibles de l'acétylcholinestérase, non organophosphorés (donepezil, rivastigmine, galantamine). Des études sur des composés organophosphorés ont été menées, notamment sur le **métrifonate**, initialement employé comme anti-helminthique, et qui apparaissait comme un candidat intéressant (Hallak and Giacobini 1987 ; Lopez-Arrieta and Schneider 2006). Des études de phase I et de phase II avaient été réalisée en vue d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché du métrifonate comme traitement de la maladie d'Alzheimer (Cutler, Jhee *et al.* 1998). Néanmoins, des dysfonctionnements neuromusculaires et des paralysies respiratoires ont été constatés sur des patients lors des essais cliniques. La compagnie pharmaceutique Bayer a retiré sa demande d'AMM et le développement du métrifonate comme traitement de la maladie d'Alzheimer a été stoppé (Lopez-Arrieta and Schneider 2006).

2. Le mécanisme d'action des toxiques organophosphorés

2-1. La cible : les cholinestérases

Les cholinestérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'esters de choline (acétylcholine, butyrylcholine, succinylcholine) en acide carboxylique et en choline.

L'**acétylcholinestérase** (AChE ; EC 3.1.1.7) se localise principalement au niveau des synapses cholinergiques du système nerveux central ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires mais également au niveau de la membrane érythrocytaire. La **butyrylcholinestérase** (BChE ; EC 3.1.1.8), quant à elle, est abondante au niveau plasmatique (environ 5 mg/ml) mais est présente également dans de nombreux tissus (foie, intestin, poumons, cœur, muscles, cerveau). Elle présente de nombreuses homologies avec l'AChE, notamment au niveau de sa séquence (54%), de la structure tridimensionnelle et du mécanisme catalytique.

2-1-1. Le rôle catalytique de l'acétylcholinestérase

Le principal rôle de l'AChE est de réguler l'influx nerveux au niveau des synapses cholinergiques, centrales et périphériques, et au niveau des jonctions neuromusculaires, en hydrolysant le neurotransmetteur ACh.

2-1-1-1. Le mécanisme de transmission de l'influx nerveux dans une synapse cholinergique

Au niveau de la cellule présynaptique (figure 7), la synthèse de l'ACh est catalysée par la choline acétyltransférase (CAT) (1), à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A. La CAT migre du cytoplasme du neurone vers la terminaison axonale où elle jouera son rôle catalyseur. L'acétyl-coenzyme A est formé dans les mitochondries de la cellule nerveuse (2) et la choline, non synthétisée, est recaptée du milieu extracellulaire (fente synaptique) par la cellule présynaptique (3). L'ACh ainsi synthétisée, est stockée dans des vésicules de la membrane présynaptique des cellules cholinergiques (4). Chaque vésicule contient une quantité constante de molécules d'ACh, soit environ 4 000. Lors d'un influx nerveux, un potentiel d'action (PA) arrive au niveau de la membrane présynaptique (5) et entraîne sa dépolarisation. Des canaux membranaires Ca^{2+} s'ouvrent, laissant entrer des ions calcium Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire (6) et provoquant l'exocytose des vésicules contenant l'ACh vers la fente synaptique (7). Une fois libérée, les molécules d'ACh diffusent de l'autre côté de la synapse et se fixent sur les récepteurs présents au niveau de la membrane post-synaptique (8), permettant ainsi la propagation de l'influx nerveux.

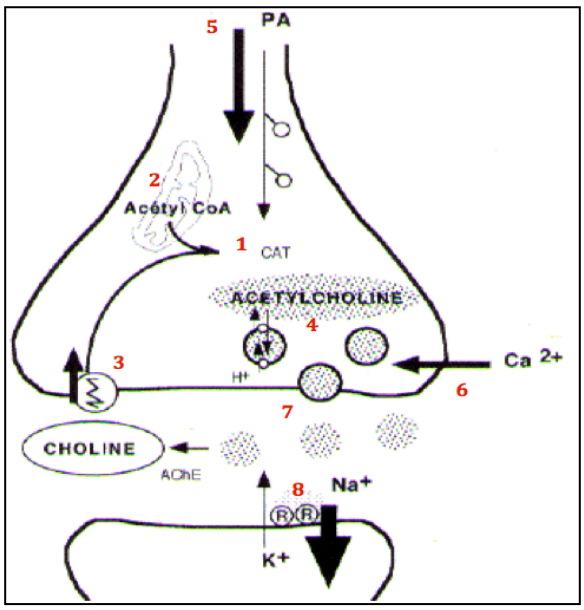


Figure 7 : Représentation schématique d'une synapse cholinergique
(source : http://neurobranches.chez-alice.fr/neurophy/acetylcholine.html)

Il existe différents récepteurs cholinergiques (figure 8).

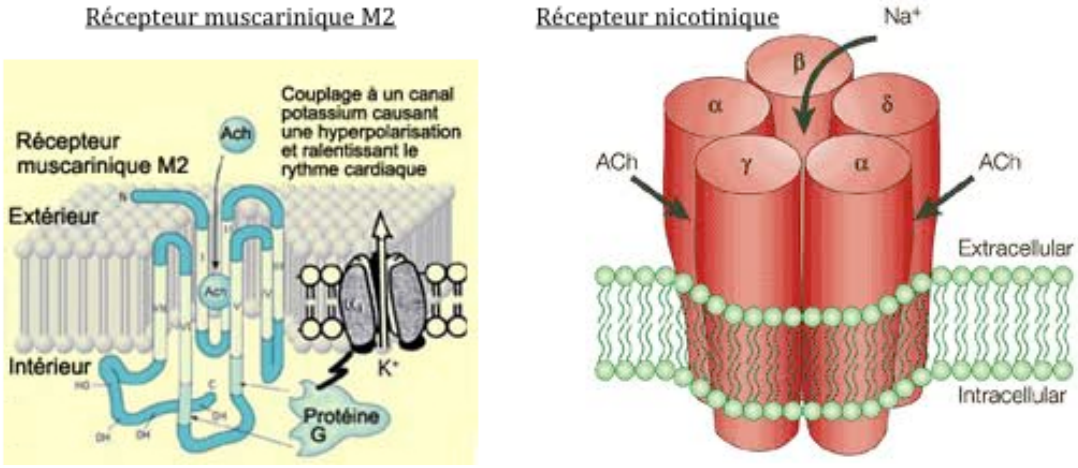


Figure 8 : Structure générale des récepteurs muscarinique et nicotinique. (source : http://thebrain.mcgill.ca/flash/i/i_06/i_06_m/i_06_m_mou/i_06_m_mou.htlm et http://www.nuk.usz.ch/UeberUns/Radiopharmacy/Research/Seiten/default.aspx).

Les **récepteurs muscariniques** sont des protéines membranaires à 7 hélices couplés à une protéine G située dans le cytoplasme de la cellule post-synaptique. Par modification de la conformation du récepteur lors de la fixation de l'ACh, la sous-unité α de la protéine G échange son GDP par un GTP, et se détache du complexe formé par les sous-unités β et γ. Lorsque G_{α} a hydrolysée son GTP en GDP, le complexe récepteur-$G_{\alpha\beta\gamma}$ se reforme.

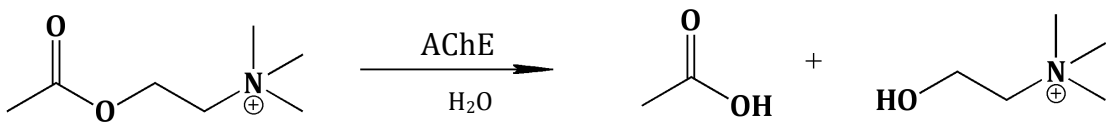
G_{α} et $G_{\beta\gamma}$ peuvent activer des voies différentes suivant les 5 classes de récepteur, de M1 à M5 (Hulme, Birdsall *et al.* 1990 ; Caulfield and Birdsall 1998). Les récepteurs

M1 (SNC, ganglions), M3 (SNC, poumons, intestins, estomac, glandes salivaires, œil) et M5 ont un effet excitateur. La sous-unité α de la protéine G associée active une phospholipase C responsable, selon les tissus, de la contraction musculaire ou de la modulation de l'excitabilité des neurones. Les récepteurs M2 (cœur, muscles lisses) et M4, quant à eux, ont un effet inhibiteur, le complexe $G_{\beta\gamma}$ de la protéine G activant l'ouverture de canaux K^+ au niveau de la membrane post-synaptique (Brown 2010). Les ions potassium K^+ intracellulaires peuvent alors sortir créant le courant ionique nécessaire à la propagation du signal.

Les **récepteurs nicotiniques** sont des récepteurs ionotropes pentamériques transmembranaires, localisés au niveau du SNC, des ganglions (récepteurs N1) et des jonctions neuromusculaires (récepteurs N2) (Paterson and Nordberg 2000). La fixation de deux molécules d'ACh sur le récepteur entraîne l'ouverture de canaux perméables aux ions sodium Na^+ et/ou potassium K^+ selon le sous-type de récepteur. L'entrée de cations dans le compartiment post-synaptique crée une dépolarisation de la membrane et une propagation de l'influx nerveux pour les récepteurs N1 ou une contraction musculaire pour les récepteurs N2. Les récepteurs nicotiniques sont également présents sur d'autres types cellulaires comme les lymphocytes B et T et les kératinocytes (Gotti, Fornasari *et al.* 1997).

2-1-1-2. La régulation de la transmission de l'influx nerveux

Pour permettre la régulation de la transmission synaptique, l'AChE hydrolyse l'ACh en choline et acide acétique (schéma 9). Cette enzyme existe sous différentes formes moléculaires possédant des propriétés catalytiques similaires mais différant par son assemblage oligomérique et son mode d'ancrage à la surface de la cellule post-synaptique. L'hydrolyse de l'ACh est très rapide, de l'ordre de 25 000 molécules par seconde et par molécule d'AChE.



acétylcholine — acide acétique — choline

Schéma 9 : Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine

2-1-2. Les rôles non catalytiques de l'acétylcholinestérase (Soreq and Seidman 2001 ; Cousin, Strahle *et al.* 2005)

2-1-2-1. L'adhésion cellulaire

Elle présente une homologie de séquences avec certaines protéines d'adhésion impliquées dans le développement du système nerveux : la **neurotactine**, un récepteur de surface au niveau axonal et la **neuroligine**, protéine d'adhésion de la membrane post-synaptique (Scholl and Scheiffele 2003 ; Leone, Comoletti *et al.* 2010). Certaines formes d'autisme et de retard mental sont d'ailleurs associées à des mutations de la neuroligine (Laumonnier, Bonnet-Brilhault *et al.* 2004 ; Zhang, Milunsky *et al.* 2009).

2-1-2-2. L'assemblage des plaques amyloïdes

L'un des dommages observés dans le tissu cérébral des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, est l'accumulation de plaques amyloïdes. Ces plaques sont des agrégats extracellulaires de peptides Aβ, résultant du clivage de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) par la β-sécrétase (Masters, Simms *et al.* 1985 ; Mattson 2004). L'AChE accélèrerait l'assemblage des plaques amyloïdes, par l'intermédiaire de son site périphérique, en formant des complexes AChE-peptide Aβ (Inestrosa, Alvarez *et al.* 1996 ; Alvarez, Opazo *et al.* 1997). Ces complexes modifieraient, entre autre, l'homéostasie calcique et la fonction mitochondriale au niveau des neurones de l'hippocampe (Dinamarca, Sagal *et al.* 2010). De nombreuses recherches ont lieu afin de mettre au point une nouvelle thérapeutique de la maladie d'Alzheimer basée sur le ralentissement de la formation des plaques amyloïdes via l'occupation du site périphérique de l'AChE. De plus, l'occupation réversible du site périphérique permet d'inhiber l'AChE et induit l'accumulation d'ACh dans la fente synaptique, ce qui a pour effet d'augmenter la stimulation des récepteurs cholinergiques.

2-1-2-3. La neuritogenèse

Des études ont montré l'implication de l'AChE dans la croissance des neurites, projections du corps cellulaire des neurones (axone et dendrite) (Sharma, Koenigsberger *et al.* 2001) (Paraoanu and Layer 2008). Des inhibiteurs du site

périphérique de l'AChE pourraient bloquer la neuritogenèse (Small, Reed *et al.* 1995 ; Howard, Bucelli *et al.* 2005).

2-1-2-4. L'hématopoïèse et la thrombopoïèse

L'AChE possèderait une activité hématopoïétique et thrombopoïétique du fait de sa présence dans les précurseurs des cellules sanguines (Lev-Lehman, Deutsch *et al.* 1997). Des études ont montré l'implication du système cholinergique, et plus particulièrement de l'AChE, dans certains dysfonctionnements immunitaires comme la prolifération myéloïde chez les patients atteints de leucémies (Perry and Soreq 2004) (Battisti, Schetinger *et al.* 2009).

2-1-3. Le rôle de la butyrylcholinestérase (Darvesh, Hopkins *et al.* 2003)

L'existence « normale » d'individus possédant des variants silencieux pour la BChE (absence de la protéine ou présence de protéine inactive) suggère que cette enzyme n'a pas de fonction vitale chez l'être humain. Des études sur des souris, dont le gène codant pour l'AChE a été délété, montrent que la BChE, sous certaines conditions, pallie l'absence d'AChE au niveau du système nerveux, notamment comme protecteur d'un excès d'ACh (Li, Stribley *et al.* 2000 ; Girard, Bernard *et al.* 2007). Néanmoins, ce n'est pas son seul rôle (Blondet, Carpentier *et al.* 2010). D'après certaines études, la BChE serait un acteur clé pendant le développement embryonnaire, au niveau de la neurogenèse notamment (Chatonnet and Lockridge 1989) (Mack and Robitzki 2000).

Comme il n'existe pas de carboxylestérase dans le plasma humain, on reconnaît à la BChE une importance pharmacologique dans la détoxication plasmatique des composés estérifiés tels que la succinylcholine, l'aspirine, l'héroïne, la cocaïne (Li, Sedlacek *et al.* 2005). Par exemple, la succinylcholine, employée comme curare de courte durée, est uniquement hydrolysée par la BChE. Chez certains patients, une mutation (D70G) à l'entrée du site actif de l'enzyme altère l'affinité pour ce substrat. L'emploi de la succinylcholine entraîne alors des apnées prolongées (Masson, Legrand *et al.* 1997 ; Mollerup and Gatke 2011). La BChE est également la principale enzyme connue pour la dégradation de la cocaïne (Lynch, Mattes *et al.* 1997). Des études actuelles ont pour objet la modification de la BChE afin de lui conférer une meilleure activité cocaïne hydrolase (Xue, Ko *et al.* 2011). Enfin, tout

comme l'AChE, la BChE réagit irréversiblement avec les composés organophosphorés. Cela lui confère la capacité de piéger les OP et d'agir comme un bioépurateur naturel. De nombreuses études dans ce sens continuent à être menées (Masson, Nachon *et al.* 2008) (Nachon, Carletti *et al.* 2011) (cf. chapitre 1, paragraphe « La butyrylcholinestérase humaine et ses mutants », page 55).

2-1-4. La structure des cholinestérases

2-1-4-1. La structure quaternaire

Contrairement aux invertébrés, l'AChE des vertébrés est codée par un gène unique, distinct de celui codant pour la BChE (Gnatt, Ginzberg *et al.* 1991). Chez l'Homme, le gène codant pour l'AChE se situe sur le chromosome 7q22, et fait environ 7 kb (6 exons et 4 introns) (Getman, Eubanks *et al.* 1992). Celui de la BChE, localisé sur le chromosome 3q26, est beaucoup plus étendu (73 kb) et contient 4 exons dont le second contient 83% de la séquence codante de la protéine mature, l'extrémité N-terminale et le site catalytique (Arpagaus, Kott *et al.* 1990) (figure 10).

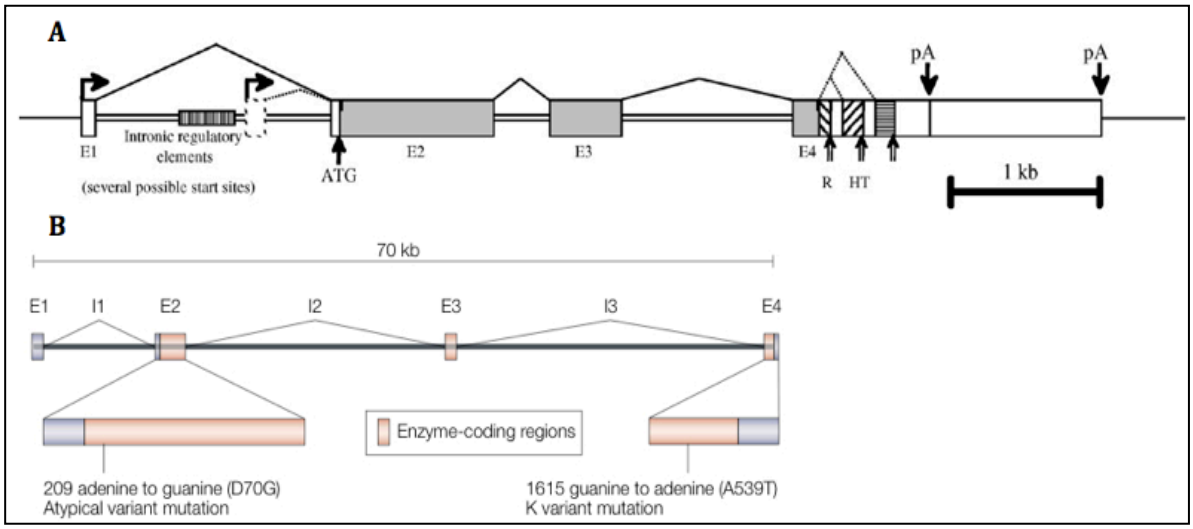


Figure 10 : Organisation des gènes de l'AChE (A) (Massoulie, Perrier et al. 2008) et de la BChE (B) (Darvesh, Hopkins et al. 2003) chez les mammifères. (E : exons, I : introns, pA : site de polyadénylation, les codons stop sont indiqués par une double flèche verticale).

L'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles donnent lieu à trois formes connues pour l'AChE, différentes de par leur extrémité C-terminale. Celle-ci détermine la maturation et le devenir de l'enzyme (Li, Camp *et al.* 1993). La BChE, quant à elle, ne code que pour un seul transcrit, ne donnant lieu qu'à une seule forme moléculaire (Massoulie, Sussman *et al.* 1993).

L'extrémité C-terminale, dite hydrophobe, du transcrit H (**forme $AChE_H$**) est capable de s'associer à un glycophosphatidylinositol (GPI), ancrant ainsi la protéine à la membrane cellulaire. Deux cystéines permettent sa dimérisation (Coussen, Ayon *et al.* 2001). La forme $AChE_H$ est majoritaire chez les invertébrés (mollusques, insectes) (Toutant, Arpagaus *et al.* 1988). Chez les vertébrés, cette forme n'a été identifiée que chez le poisson torpille et les mammifères. L'$AChE_H$ se localise dans le cerveau, les organes électriques et les muscles striées chez la torpille (Bon 1982) et essentiellement à la surface des cellules sanguines chez les mammifères (Haas, Brandt *et al.* 1986).

La **forme $AChE_S$**, soluble, est observée dans le venin de serpent *Bungarus multicintus*. Ces glandes sécrètent une forme monomérique de l'AChE dont l'extrémité C-terminale est clivée au cours de la sécrétion (Cousin, Creminon *et al.* 1996). Trois espèces moléculaires solubles de BChE (**$BChE_S$**), hydrophiles et symétriques, existent sous forme monomérique (G_1) ou oligomérique (G_2 et G_4). La forme G_2 est un dimère de G_1, les monomères étant reliés par un pont disulfure entre les Cys571. La forme G_4 est un dimère de G_2, assemblé en tétramère par interactions hydrophobes (Darvesh, Hopkins *et al.* 2003).

La forme moléculaire majoritaire d'AChE et de BChE retrouvée chez les vertébrés possède une extrémité C-terminale amphiphile appelée peptide T (**$AChE_T$** et **$BChE_T$**). Ce peptide T possède une série de 7 résidus aromatiques conservés, dont trois tryptophanes (domaine WAT : « Tryptophan Amphiphilic Tetramerization »), sur la même face d'une hélice α ainsi qu'une cystéine, permettant la formation d'un pont disulfure entre deux monomères. Les hélices α de quatre monomères s'associent à un peptide riche en proline appelé PRAD (Proline-Rich Attachment Domain) par le biais d'interactions noyau aromatique/proline (Proline-Rich Attachment Domain)(Massoulie 2002). Le peptide PRAD constitue l'extrémité N-terminale, soit de la protéine collagénique ColQ (Cousin, Creminon *et al.* 1996), elle-même insérée dans la lame basale des jonctions neuromusculaires, soit de la protéine PRiMA (Proline-Rich Membrane Anchor), elle-même insérée au niveau des membranes cellulaires des neurones (Perrier, Massoulie *et al.* 2002). Pour ces deux protéines, le peptide PRAD possède 2 ou 4 cystéines. Les formes $AChE_T$ et $BChE_T$ sont asymétriques et amphiphiles. ColQ possède jusqu'à trois peptides PRAD, permettant un assemblage asymétrique avec trois tétramères maximum (A_4,

A_8, A_{12} ; figure 11). 98 % de la BChE plasmatique, soluble, apparaît sous forme tétramérique, assemblée autour d'un peptide PRAD, issu de la lamellipodine (Li, Schopfer *et al.* 2008).

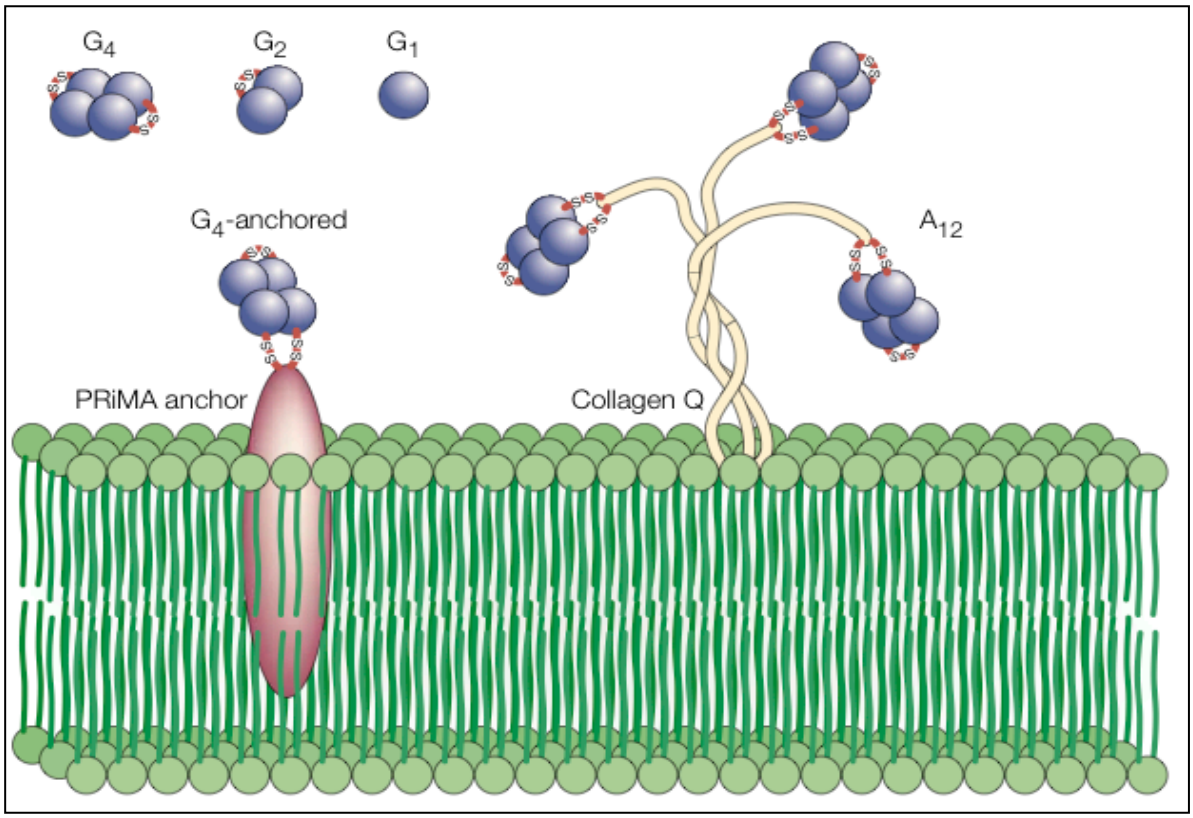


Figure 11 : Représentation des différentes formes moléculaires des ChEs (Darvesh, Hopkins et al. 2003)(G1, G2 et G4, respectivement formes solubles monomérique, dimérique et tétramérique ; G4-anchored, forme tétramérique associée à la protéine PRiMA ; A12, forme tétramérique associée à la protéine ColQ via trois peptides PRAD)

Une forme supplémentaire pour l'AChE a été mise en évidence chez la torpille et certains mammifères, correspondant à un transcrit dont l'épissage entre les exons 4 et 5 n'a pas lieu (**$AChE_R$** pour « read-through » ≈ trans-lecture) (figure 10) (Li, Camp *et al.* 1993). Cette conservation d'un intron conduit à une forme sécrétée et soluble. L'$AChE_R$ serait impliquée dans des pathologies neuromusculaires auto-immunes dont la myasthénie grave (Brenner, Hamra-Amitay *et al.* 2003). En effet, l'accumulation d'$AChE_R$ entraine une diminution de l'excitabilité des récepteurs cholinergiques, ayant, à terme, des conséquences au niveau neuromusculaires (Lev-Lehman, Evron *et al.* 2000). Elle aurait aussi un rôle dans des neuropathies associées à l'inflammation (Dori, Ifergane *et al.* 2007).

2-1-4-2. L'organisation structurale liée à la fonction catalytique

Les ChEs font partie de la famille des **carboxylestérases de type B**, et plus particulièrement des **α/β hydrolases à sérine** (Carr and Ollis 2009). Les hydrolases à sérine se structurent autour d'un feuillet β flanqué d'hélices α. Elles possèdent une triade catalytique, composée d'une sérine nucléophile activée par un relais de protons impliquant un résidu acide (Asp ou Glu) et une histidine (figure 12). Les ChEs possèdent des sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr), 3 sites pour l'hAChE, 4 pour la *Tc*AChE et 9 pour la BChE (Nachon, Nicolet *et al.* 2002). Ces glycanes contribuent à la sécrétion, la solubilité et la stabilité de l'enzyme dans son environnement, sans influencer ses propriétés catalytiques (Velan, Kronman *et al.* 1993).

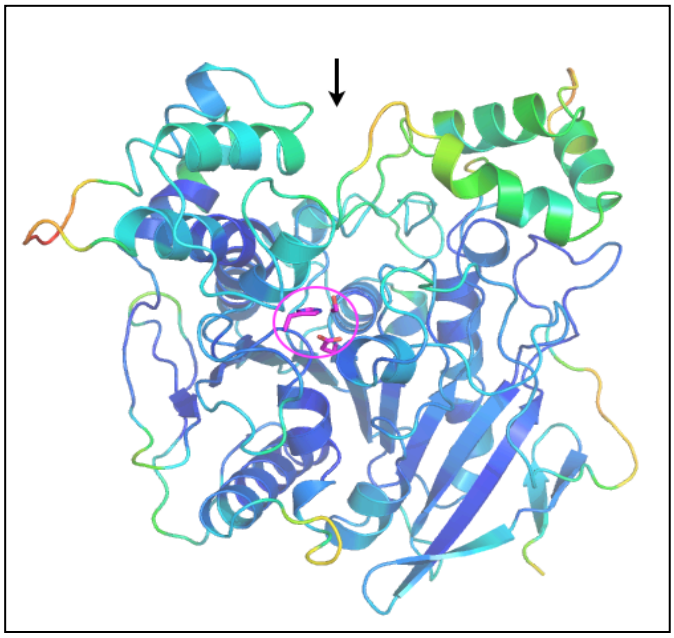


Figure 12: Structure tertiaire de la BChE (code pdb : 1p0i). La coloration dépend du degré d'agitation atomique au sein de l'enzyme (du bleu foncé, le moins agité au rouge le plus agité). Le cercle rose situe la triade catalytique, elle-même en rose, et la flèche représente l'entrée de la gorge.

Les connaissances structurales de l'hAChE, et de la *Tc*AChE avant elle, ainsi que de la BChE, ont permis de mieux comprendre leur mécanisme catalytique à l'échelle moléculaire. Le site actif de l'AChE se caractérise par deux sites, distincts mais coordonnés. Le **site catalytique** se situe au fond d'une gorge de 20 Å de profondeur et d'environ 5 Å de diamètre, dont l'entrée est constituée de résidus formant le **site périphérique**. Les substrats et ligands progressent le long de cette gorge tapissée par 14 résidus pour aboutir au site catalytique, lui-même divisé en trois sous-sites : le sous-site d'interaction cation-π ou poche "choline", la poche "acyle" où se lie la partie acyle des substrats, et entre les deux, le sous-site estérasique comprenant la triade catalytique et le trou oxyanion (figure 13). Les

différences structurales entre AChE et BChE viennent de la dimension du site catalytique (500 Å^3 pour la BChE contre 300 Å^3 pour l'AChE) ainsi que de la nature de certains résidus du site périphérique et d'un des sous-sites catalytiques. Ces dissemblances sont à l'origine des différentes propriétés catalytiques des deux enzymes, en ce qui concerne la nature des substrats et ligands et la stéréosélectivité.

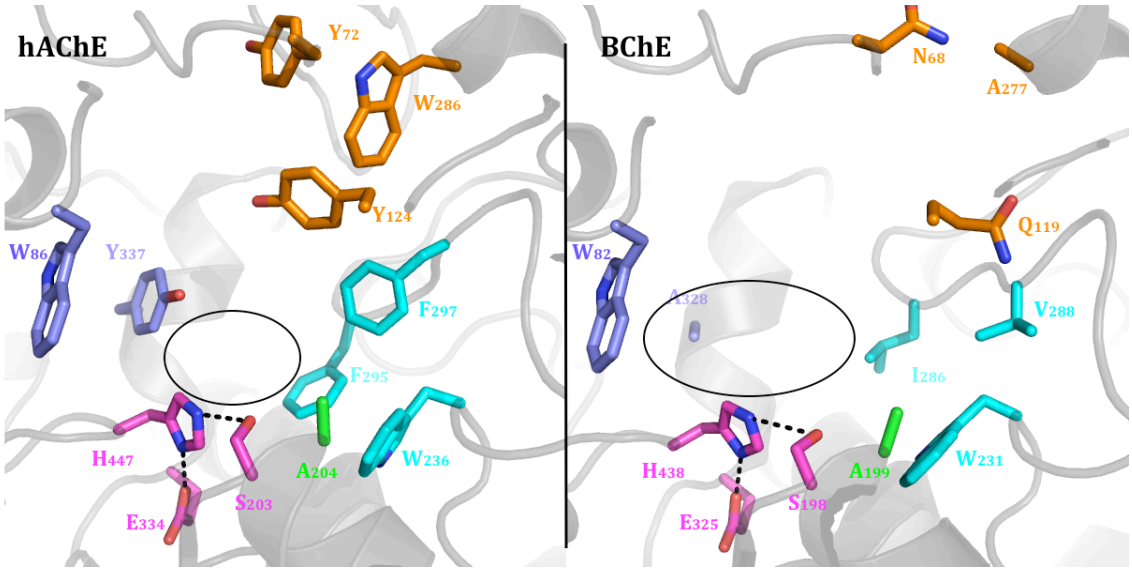


Figure 13 : Site actif de l'hAChE (à gauche) et de la BChE (à droite). Le site catalytique est formé de la triade catalytique (magenta), du trou oxyanion (vert), de la poche « acyle » (cyan), de la poche « choline » ou site cation-π (violet). Le site périphérique est situé à l'entrée de la gorge (orange). Le cercle noir représente le volume du site actif. (code pdb 2x8b pour hAChE, 1p0i pour BChE).

Le ***site catalytique*** est divisé en trois sous-sites :

1.- Le sous-site estérasique comprend la triade catalytique formée par trois résidus, Ser203 (Ser198), His447 (His438) et Glu334 (Glu325) (le résidu hors parenthèse appartient à l'hAChE, celui entre parenthèse à la BChE) (Shafferman, Velan *et al.* 1992). Lors de la réaction catalytique, la sérine est acylée puis déacylée, grâce à un relais de protons impliquant l'imidazolium de l'histidine et le carboxylate du glutamate. Un second glutamate, Glu202 (Glu197), intervient dans la stabilisation des états de transition par interactions électrostatiques (Ordentlich, Barak *et al.* 1996). Le mécanisme d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE est un des mécanismes catalytiques les plus efficaces : on compte jusqu'à 25 000 molécules d'ACh hydrolysées par seconde et par site actif chez l'Homme.

Le trou oxyanion est composé de Gly121 (Gly116), Gly122 (Gly117), Ala204 (Ala199). Chaque NH- de la chaîne principale contribue à la stabilisation de

l'oxyanion de l'état de transition au cours de la réaction d'hydrolyse des esters grâce à 3 liaisons hydrogène. La structure cristallographique du complexe *Tc*AChE en présence de 4-oxo-N,N,N-triméthylpentanaminium (OTMA), un analogue non hydrolysable de l'ACh, le met particulièrement en évidence (figure 14) (Sussman, Harel *et al.* 1991 ; Colletier, Fournier *et al.* 2006).

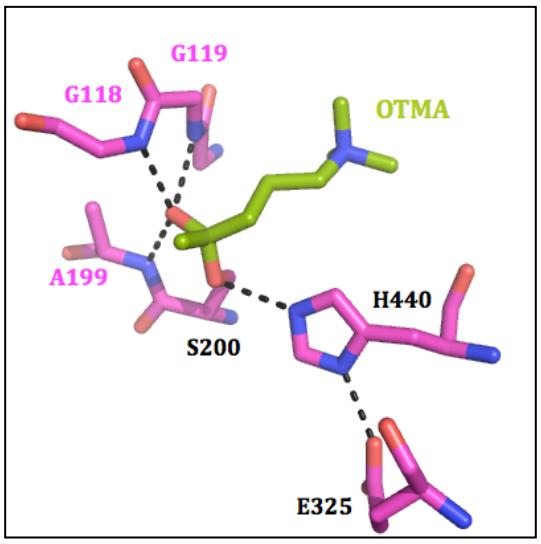


Figure 14 : Triade catalytique et trou oxyanion de la TcAChE, en présence de OTMA (code pdb : 2c5f). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés noirs.

2.- Le site d'interaction cation-π est le sous-site de liaison de la partie choline du substrat naturel. La charge du groupement ammonium quaternaire est stabilisée par des interactions de type cation-π avec un tryptophane (Trp82 dans l'hAChE, Trp86 dans la BChE) (figure 15) (Ordentlich, Barak *et al.* 1993) (Harel, Schalk *et al.* 1993) (Colletier, Fournier *et al.* 2006). Dans l'AChE, un second résidu aromatique est associé au tryptophane (Tyr337 chez l'Homme, Phe330 chez la torpille).

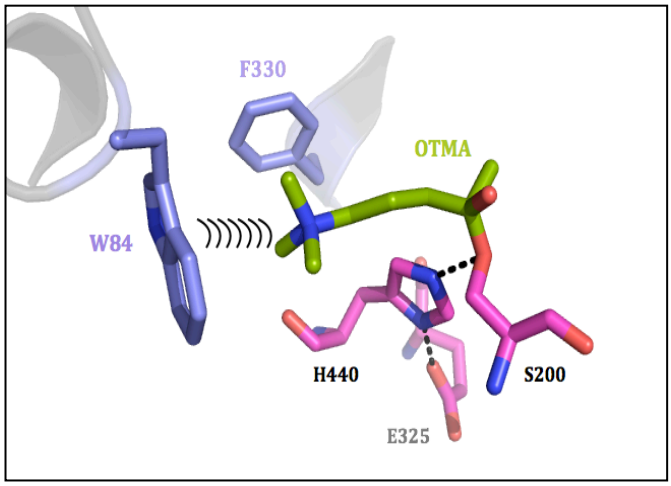


Figure 15 : Site d'interaction cation-π (violet) de la TcAChE, en présence de OTMA (code pdb : 2c5f). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés noirs.

3.- Dans l'hAChE, la poche « acyle » est constituée de résidus aromatiques (Trp236, Phe295, Phe297) alors que dans la BChE, seul le tryptophane est conservé (Trp231). Les deux autres sont de petits résidus aliphatiques (Ile286, Val288) (Harel, Sussman *et al.* 1992). Cette différence confère à la BChE une sélectivité moins stricte quant à la taille des ligands (figure 13). Ces résidus aromatiques dans l'AChE stabilisent les ligands par interactions de Van der Waals, notamment la chaîne carbonée de la partie acyle des substrats naturels (méthyle de l'ACh, butyle de la BCh).

Le ***site périphérique*** se situe à l'entrée de la gorge. Dans l'hAChE, il est constitué de trois résidus aromatiques, Trp286, Tyr72 et Tyr124, qui fixent les ligands cationiques par interactions de type cation-π (Harel, Schalk *et al.* 1993). En face de ce site périphérique sont présents deux résidus, Tyr341 et Asp74 (Tyr334 et Asp72 dans *Tc*AChE, figure 16), qui structurent, par liaison hydrogène, la conformation de la gorge, et interagissent également avec les ligands (Barak, Kronman *et al.* 1994 ; Bourne, Taylor *et al.* 2003). Les trois résidus aromatiques constituant le site périphérique sont absents dans la BChE. Il sont remplacés par un résidu aliphatique (Val277) et deux résidus portant une fonction amide (Gln119 et Asn68) (figure 13). Ainsi, les ligands du site périphérique de l'AChE ont peu d'affinité pour la BChE. Des études de marquage par photo-affinité ont montré que le résidu Tyr332 (Tyr341 dans l'hAChE) était impliqué dans l'interaction des ligands au niveau de l'entrée de la gorge chez la BChE et pouvaient constituer un site périphérique (Nachon, Ehret-Sabatier *et al.* 1998).

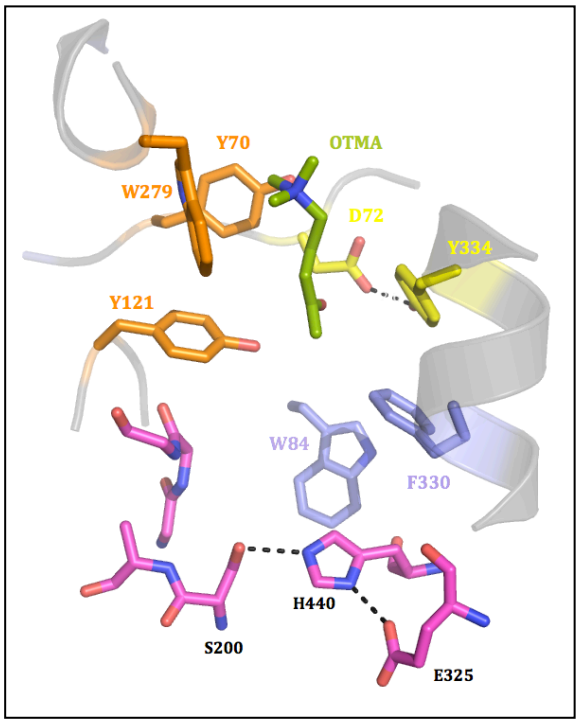


Figure 16 : Dans la TcAChE, le site périphérique (orange) lie une molécule de OTMA via des interactions type cation-π entre W279 et l'ammonium quaternaire du ligand (code pdb : 2c5f). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés noirs.

Le site périphérique joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de régulation allostérique de la catalyse de l'AChE. Il a été mis en évidence que le site périphérique et le site catalytique sont en relation directe via la boucle Ω (liaison hydrogène Asp72 et Tyr334, figure 16), via un réseau conservé de molécules d'eau (Barak, Ordentlich *et al.* 1995 ; Ordentlich, Barak *et al.* 1995) et des interactions aromatiques/aromatiques (Kaplan, Barak *et al.* 2004). Il a été démontré qu'un relais d'interactions, impliquant des résidus tout le long de la gorge, a lieu entre le site périphérique et le site catalytique entrainant des changements conformationnels influant sur le mécanisme catalytique (Shafferman, Velan *et al.* 1992).

Lors de son approche de la gorge, une molécule de substrat va être captée au niveau du site périphérique, puis va ensuite glisser le long de la gorge pour se positionner dans le site catalytique. L'association d'une seconde molécule de substrat au niveau du site périphérique augmente la vitesse d'hydrolyse, et ce, pour de faibles concentrations en substrat (Johnson, Cusack *et al.* 2003). En revanche, un excès de substrat (Aldridge and Reiner 1969 ; Radic, Reiner *et al.* 1991) ou la fixation permanente d'un ligand au site périphérique (ex : propidium, inhibiteur réversible) entraine un blocage de l'entrée du substrat dans le site actif et de la sortie des produits d'hydrolyse (Rosenberry, Mallender *et al.* 1999 ;

Szegletes, Mallender *et al.* 1999 ; Mallender, Szegletes *et al.* 2000). L'activité enzymatique est alors ralentie.

Dans la BChE, l'entrée de la gorge est plus spacieuse en raison de l'absence de cluster de résidus aromatiques semblable à celui de l'AChE. Aussi, suivant les différents substrats dérivés de la choline, on aura, soit une activation par excès de substrat pour les petites molécules (acétylcholine, butyrylcholine,…) (Masson, Adkins *et al.* 1993 ; Masson, Legrand *et al.* 1997), soit une inhibition pour les molécules plus importantes (benzoylcholine) (Masson, Froment *et al.* 2007). Cette modulation implique le couple de résidus Asp70 et Tyr332 liés par une liaison hydrogène. En découle l'altération de l'affinité des substrats chargés, la succinylcholine en particulier, pour le mutant naturel Asp70Gly, dit variant atypique. (Masson, Froment *et al.* 1996 ; Masson, Xie *et al.* 1999). La succinylcholine, qui possèdent deux ammoniums quaternaires, l'un se fixant dans le site cation-π l'autre au niveau de Tyr332, voit son hydrolyse largement ralentie du fait de cette mutation (Neville, Gnatt *et al.* 1990 ; Masson, Legrand *et al.* 1997 ; Mollerup and Gatke 2011).

Enfin, certains auteurs avancent que la très grande efficacité catalytique de l'AChE pourrait s'expliquer par la présence d'une sortie alternative pour les produits d'hydrolyse appelée la « ***backdoor*** » (porte arrière). L'argument avancé tient du fait que les dimensions restreintes de la gorge ainsi que le potentiel électrostatique présent semblent incompatibles avec le trafic croisé de molécules de substrat et de produit avec la rapidité que l'on connaît de l'hydrolyse chez l'AChE (Gilson, Straatsma *et al.* 1994). Cependant, les premières études réalisées par mutagenèse dirigée de résidus proches ou appartenant à la « backdoor » supposée (Glu84, Trp86, Asp131 et Val132), n'ont révélé aucune différence significative d'efficacité catalytique entre l'enzyme sauvage et les mutants, concluant ainsi que cette hypothétique « backdoor » ne serait finalement pas impliquée de manière fonctionnelle dans l'activité catalytique (Kronman, Ordentlich *et al.* 1994).

Puis des études sur l'interaction entre la fasciculine, une toxine peptidique, et l'AChE de souris ont relancé cette hypothèse. Bien que la fasciculine se fixe à l'entrée de la gorge, occluant complètement celle-ci, le complexe garde une activité résiduelle (Radic and Taylor 2001). Ceci suggère que le substrat est capable d'emprunter une route alternative à l'entrée de la gorge pour accéder au site actif.

Des études de dynamique moléculaire ont appuyé cette hypothèse en montrant la possibilité de mouvement de la boucle Cys69–Cys96, dite " boucle Ω" qui forme une des parois de la gorge, ceci lorsque l'AChE est en présence ou en absence de fasciculine. Le réarrangement moléculaire de la boucle Ω, observé en dynamique moléculaire, correspond à l'ouverture d'une voie secondaire pour entrer et/ou sortir du site actif de l'enzyme : la « backdoor » (Bui, Tai *et al.* 2004). Cette dynamique a également été mise en évidence lors de la résolution de la structure de *Tc*AChE en présence d'aflatoxine, une toxine de champignon, dans laquelle une rotation à 90° de Tyr442 est observable pour permettre l'ouverture de cette backdoor (Sanson, Colletier *et al.* 2011). Enfin, des études sur l'acétylcholinestérase de *Drosophila melanogaster* ont permis de mettre en évidence que le Trp83, qui appartient à la boucle Ω, est capable de pivoter légèrement, du fait de sa faible stabilisation par les résidus environnants (Ile82 et Asp482, remplaçant respectivement des résidus Met et Tyr présents chez la plupart des autres AChE). Cependant, le passage par ce canal est estimé à seulement 5 % du trafic des produits pour l'enzyme sauvage. En revanche, les mutations Trp83Glu et Trp83Ala permettent d'élargir ce canal de 5 à 9 Å et dans ce cas, l'inhibition de l'activité catalytique par excès de substrat due à une obstruction à l'entrée de la gorge est absente car les produits peuvent sortir du site actif par cette voie secondaire, sans croiser les molécules de substrat entrantes (Nachon, Stojan *et al.* 2008).

2-2. Le mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés

Les organophosphorés sont des molécules très lipophiles, qui franchissent facilement les barrières biologiques (voies transcutanée, respiratoire et digestive). Après absorption, ils se fixent principalement sur l'acétylcholinestérase centrale, musculaire et érythrocytaire ainsi que sur la butyrylcholinestérase du système nerveux central et plasmatique, empêchant ainsi l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine. Une faible quantité franchit la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité cholinestérasique (Vale 1998).

Lorsque l'OP arrive à proximité de la sérine catalytique, l'oxygène de cette dernière, activé par un réseau de liaisons hydrogène, attaque l'atome de phosphore, ce qui

conduit à un état de transition bipyramidal, qui évolue vers un adduit tétraédrique via la rupture de la liaison entre le phosphore et le groupe partant de l'OP (figure 17). Il s'agit d'une réaction d'addition-élimination. La phosphylation de l'enzyme conduit à la formation d'un conjugué très stable mais qui reste réversible bien que la déphosphylation spontanée de la sérine, et donc la réactivation de l'enzyme, soit très lente (Aldridge and Reiner 1972). Elle est accélérée par l'action d'un composé plus nucléophile que l'eau, tel que les oximes. Les oximes sont d'ailleurs à la base du traitement des intoxications par les OP. Une autre réaction peut suivre la phosphylation de l'enzyme conduisant à la formation d'un conjugué également très stable et non réactivable : généralement, une désalkylation catalysée par l'enzyme elle-même (Ordentlich, Kronman *et al.* 1993), appelée communément « vieillissement » (Fleisher and Harris 1965). Un pont salin entre l'imidazolium de l'histidine catalytique et l'oxyanion de l'adduit désalkylé est à l'origine du gain de stabilité.

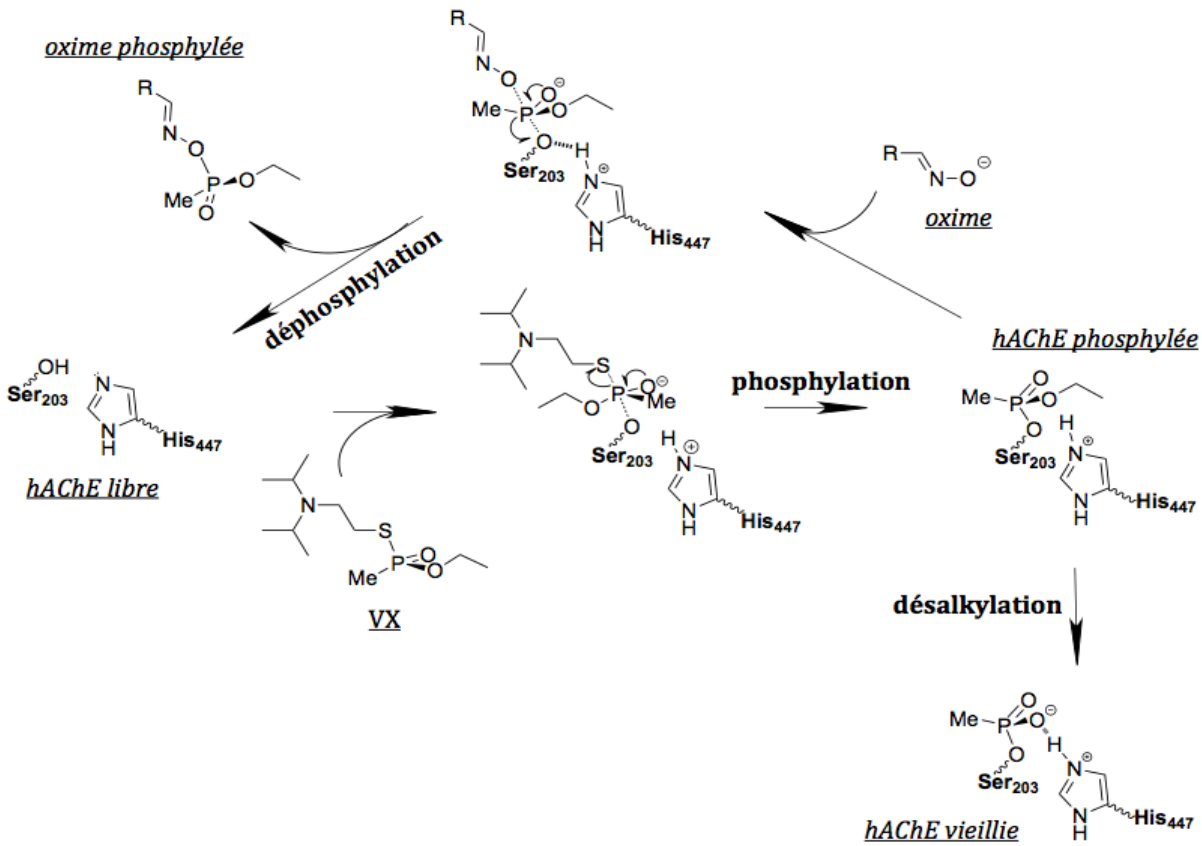


Figure 17 : Mécanisme d'inhibition, de vieillissement et de réactivation de l'hAChE par le VX. L'inhibition par phosphylation de l'enzyme a lieu par attaque de l'oxygène de la sérine catalytique (Ser203) sur le phosphore du VX. Cette dernière peut être déphosphylée par un nucléophile fort (oxime) ou être irréversiblement modifiée par désalkylation de l'adduit.

La vitesse de vieillissement dépend de la nature et de la stéréochimie du composé organophosphoré. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de vieillissement varie de quelques minutes pour l'hAChE inhibée par le soman à plusieurs dizaines d'heures pour la même enzyme inhibée par le VX (tableau 18).

	Constante de vitesse de vieillissement (h^{-1})	
	hAChE	BChE
soman	9,3[a,f]	6,6[e,f]
sarin	0,23[b]	0,05[d]
tabun	0,04[b]	0,10[d]
VX	0,02[b]	0,01[d]
VR	0,04[b]	n.m
CVX	0,02[c]	n.m
DFP	0,22[b,e]	0,69[e]

Tableau 18 : Constante de vitesse de vieillissement de l'hAChE et de la BChE vis à vis de certains organophosphorés (source : [a]Shafferman, 1996, [b]Worek, 2004, [c]Aurbek, 2006, [d]Aurbek, 2009, [e]Masson, 1997, [f]Nachon, 2005, n.m : valeur non mesurable).

La compréhension du mécanisme de vieillissement est un enjeu important sachant que cette étape compromet la réactivabilité de l'enzyme. Le mécanisme de désalkylation chez l'AChE implique la rupture de la liaison C-O et de la formation d'un ion carbonium (Harris, Fleisher *et al.* 1966 ; Michel, Hackley *et al.* 1967 ; Harel, Su *et al.* 1991 ; Segall, Waysbort *et al.* 1993 ; Shafferman, Ordentlich *et al.* 1996) (figure 19).

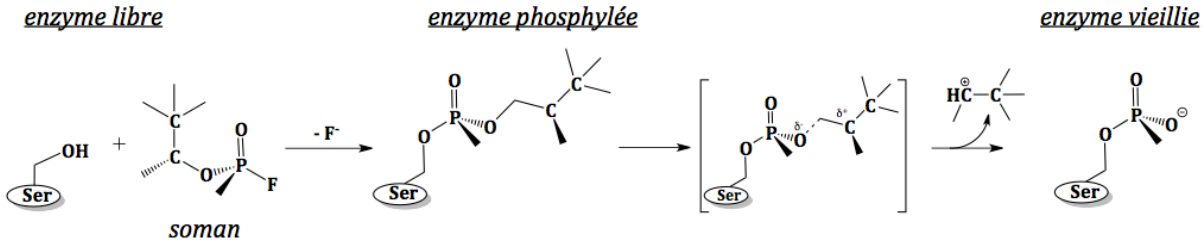


Figure 19 : Proposition de mécanisme de vieillissement de l'AChE inhibée par le soman. (La cassure de la liaison C-O conduit à la formation, d'une part, d'un ion carbonium libéré et, d'autre part, d'un oxyanion sur l'adduit phosphylé).

dans le cas du soman, la désalkylation du groupement pinacolyle est catalysée par les résidus Glu199 (chez *Tc*AChE) ainsi que l'histidine catalytique (His440). Le premier stabilise électrostatiquement le développement du carbocation alors que la charge positive de l'histidine stabilise la formation de l'oxyanion, au cours de la scission de la liaison C-O (Ordentlich, Kronman *et al.* 1993 ; Qian and Kovach 1993). Les résidus Tyr130 et Glu441 (chez *Tc*AChE) interviennent également, indirectement en figeant la conformation de Glu199, via un réseau de liaisons hydrogène impliquant des molécules d'eau (Shafferman, Ordentlich *et al.* 1996). Les résidus du site cation-π (Trp84 et Phe330) participent au mécanisme en favorisant la migration d'un méthyle vers le carbocation secondaire néoformé (Qian and Kovach 1993). Les structures tridimensionnelles de *Tc*AChE vieillie et non-vieillie ont confirmé l'implication de ces résidus dans le mécanisme de vieillissement (Millard, Kryger *et al.* 1999 ; Sanson, Nachon *et al.* 2009).

En ce qui concerne le mécanisme de vieillissement de la BChE, ce sont les structures cristallographiques des complexes BChE-échothiophate vieillie et non-vieillie qui ont suggérée l'implication d'une molécule d'eau en interaction avec Glu197 (Glu199 dans *Tc*AChE) et l'histidine catalytique. Cette molécule d'eau pouvait participer au vieillissement selon deux mécanismes : rupture de la liaison C-O par désalkylation ou rupture de la liaison P-O après attaque nucléophile SN_2 de la molécule d'eau. La discrimination entre les deux mécanismes est possible par spectrométrie de masse. Lorsque l'enzyme est inhibée puis vieillie dans de l'eau enrichie en isotope lourd ^{18}O de l'oxygène, il est possible de vérifier si une molécule d'eau a été incorporée à l'adduit en mesurant sa masse, auquel cas le mécanisme de vieillissement est une hydrolyse avec scission de la liaison P-O. Si le mécanisme est une désalkylation, l'^{18}O ne sera pas incorporée à l'adduit. Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier le mécanisme de vieillissement de la BChE inhibée pour une dizaine d'OP, de classes différentes (Li, Schopfer *et al.* 2007). Pour la majorité des OP testés, le mécanisme de vieillissement s'opère par désalkylation. Même si la scission d'une liaison P-O n'a encore jamais été observée dans le processus de vieillissement, celui-ci reste à la base du mécanisme de déphosphylation spontanée de l'enzyme. Pour certains OP (VX et VR), aucun vieillissement n'a été observé. Enfin, pour l'isomalathion, le

conjugué inhibé vieillit en deux produits, correspondant aux deux mécanismes possibles de vieillissement. Par ailleurs, après avoir longtemps cru que les conjugués de cholinestérases-phosphoramidates (tabun et ses dérivés) vieillissaient par déamination (Barak, Ordentlich *et al.* 2000 ; Ekstrom, Akfur *et al.* 2006), Carletti *et al*., ont montré à l'aide de données cinétiques, structurales et de spectrométrie de masse que le vieillissement était également une O-désalkylation (Carletti, Li *et al.* 2008 ; Carletti, Aurbek *et al.* 2009 ; Carletti, Colletier *et al.* 2010).

2-3. Les autres enzymes du SNC phosphylées par les organophosphorés

Les OP peuvent phosphyler d'autres enzymes du système nerveux central, notamment la « neuropathy target esterase » (NTE). Cette carboxylestérase est présente au niveau membranaire dans les neurones et certaines cellules non-neuronales des vertébrés (intestins, rate et thymus) (Johnson 1982). Elle est impliquée dans la voie de signalisation cellulaire contrôlant les interactions entre neurones et accessoirement, les cellules gliales au cours du développement du système nerveux (Glynn 1999). L'exposition de la NTE aux OP entraine l'apparition d'un syndrôme neuropathique retardé, mais une simple phosphylation de la sérine catalytique ne suffit pas à engendrer ce syndrôme. Ce dernier n'apparaît qu'après vieillissement de la sérine catalytique phosphylée (Johnson 1982). Dans une étude réalisée sur l'inhibition de la NTE par le DFP, le vieillissement rapide correspond à un transfert d'un isopropyle sur un autre résidu du site actif de la NTE et non à une désalkylation comme chez les cholinestérases (Clothier and Johnson 1979 ; Williams 1983).

D'autres protéines sont la cible des OP, généralement des protéines à activité estérasique mais également la glutathion S-transférase, qui semblent jouer un rôle protecteur en métabolisant par conjugaison certains pesticides organophosphorés (Kostaropoulos, Papadopoulos *et al.* 2001 ; Fujioka and Casida 2007).

3. Les effets d'une intoxication aigüe par les organophosphorés

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les OP entraine une accumulation d'acétylcholine au niveau synaptique. Ce neurotransmetteur du système nerveux est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage au niveau central et dans l'activité musculaire et les fonctions végétatives au niveau périphérique. L'accumulation

d'ACh amplifie, d'une part, la réponse des récepteurs muscariniques au niveau des cibles du système parasympathique et, d'autre part, celle des récepteurs nicotiniques au niveau ganglionnaire des systèmes sympathique et parasympathique. On observe une stimulation puis une paralysie de la transmission de l'influx nerveux par dépolarisation persistante. Le syndrôme dit « cholinergique » regroupe donc trois syndrômes différents.

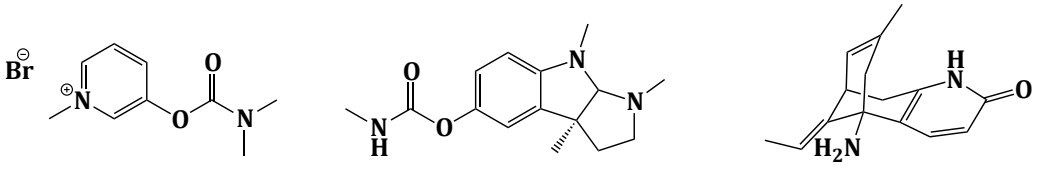
Le **syndrôme muscarinique périphérique** provoque une hypersécrétion des glandes salivaires et sudorales, entre autre ; une contraction des muscles lisses (myosis, bronchoconstriction) ; une augmentation du péristaltisme (nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales) ; une bradycardie et une hypotension. Le **syndrôme nicotinique périphérique**, quant à lui, provoque la contraction des muscles striés (asthénie intense, faiblesse musculaire, fasciculations, mouvements involontaires, paralysie des muscles respiratoires) et des troubles cardiaques (tachycardie et hypertension). Au niveau du SNC, le **syndrôme central** donne lieu à de l'agitation, de l'anxiété, des vertiges et céphalées, pouvant aller jusqu'à un état confusionnel voire un coma convulsif avec risques de choc hémodynamique.

L'atteinte cérébrale lors d'une intoxication aux OP ne se résume pas au système cholinergique. En effet, les convulsions et les liaisons cérébrales s'accompagnent d'autres symptômes comme l'œdème cellulaire ou la nécrose neuronale et mettent en jeu la perturbation d'autres systèmes de neurotransmission (glutamate, GABA, dopamine, noradrénaline)(Fosbraey, Wetherell *et al.* 1990 ; Lallement, Carpentier *et al.* 1993 ; Shih and McDonough 1997).

LES MOYENS DE DEFENSE CONTRE LA MENACE DES OP

1. Pré-traitements actuels

Lorsque des forces armées sont susceptibles d'intervenir sur un théâtre d'opérations où l'emploi d'armes chimiques est prévisible, les militaires sont prétraités par l'administration prophylactique de **pyridostigmine** (figure 20). Ce carbamate, inhibiteur pseudo-irréversible des cholinestérases, se lie transitoirement à la sérine catalytique, empêchant la fixation de l'OP (Gordon, Leadbeater *et al.* 1978). Le bromure de pyridostigmine est employé usuellement contre la myasthénie et la constipation par atonie intestinale sous le nom de Mestinon®. Pour le prétraitement d'une exposition potentielle aux OP, les personnels doivent prendre 30 mg en comprimés toutes les 8 heures. Malheureusement, la présence d'un groupement ammonium quaternaire chargé empêche le passage de la BHE et donc la protection des ChEs centrales. Un autre carbamate capable de passer la BHE, la **physostigmine** (figure 20), a été testé, mais possède une demi-vie courte et entraine des effets secondaires gênants (Dirnhuber, French *et al.* 1979). En France, les efforts de recherche se sont portés sur un alcaloïde capable d'inhiber réversiblement les ChEs périphériques et centrales. L'**huperzine A** (figure 20) est, depuis longtemps, utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise dans le traitement des troubles de la mémoire. Elle a d'ailleurs été évaluée pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (Wang, Wang *et al.* 2009) mais aucun effet cognitif n'a été mis en évidence. Le remplacement de la pyridostigmine par l'huperzine A dans le prétraitement de l'intoxication aux OP s'est posé car elle a un meilleur effet protecteur que la pyridostigmine (Grunwald, Raveh *et al.* 1994) (Lallement, Veyret *et al.* 1997). Malheureusement, le développement de cette molécule n'a pas été poursuivi car elle présente des signes de toxicité aigüe aux doses thérapeutiques (Aracava, Pereira *et al.* 2009).



pyridostigmine **physostigmine** **huperzine A**

Figure 20 : Structure chimique de la pyridostigmine, de la physostigmine et de l'huperzine A

2. Traitements actuels

La prise en charge d'individus intoxiqués par des pesticides ou des neurotoxiques organophosphorés associe décontamination, traitement symptomatique et traitement antidotique spécifique.

2-1. La décontamination

La décontamination est systématique pour éliminer la substance en contact avec l'individu et donc réduire la dose d'OP absorbée et pour éviter la contamination des personnels soignants lors de la prise en charge. Si cela apparaît nécessaire, les gestes de survie et la mise en place d'une ventilation artificielle sont réalisés avant décontamination.

En cas d'ingestion, un lavage gastrique évacuateur doit être réalisé très précocement et suivi de l'administration orale de charbon activé pour adsorber la substance ingérée. En cas d'intoxication par voie percutanée, la décontamination s'effectue selon 4 phases :

- l'absorption du toxique sur les parties découvertes du blessé à l'aide de poudres absorbantes telles que la terre à foulon, talc, farine, etc… appliquées à l'aide d'un flacon poudreur ou de serviettes éponges.
- le déshabillage complet de la victime qui permet de réduire de 80% la contamination.
- l'inactivation du toxique par pulvérisation d'une solution à 2,5° d'hypochlorite de sodium (eau de javel diluée) pendant 5 à 10 minutes sur la peau saine et d'une solution de Dakin (hypochlorite de sodium stabilisé par du permanganate de potassium) sur les plaies et les muqueuses.
- le rinçage par douche prolongée.

La décontamination est contrôlée à l'aide d'un photomètre, qui permet de mettre en évidence la présence de substances organophosphorés et organosoufrés. Ce contrôle est indispensable avant le transfert vers des structures médicales pour la mise en place des traitements symptomatiques et spécifiques.

2-2. Les traitements symptomatiques

Le traitement symptomatique de l'intoxication aux OP est essentiellement respiratoire mais également anti-convulsivant et cardiovasculaire.

La prise en charge des victimes au niveau de la réanimation respiratoire repose sur la libération des voies aériennes et sur l'oxygénothérapie. Le problème de cette prise en charge se pose en cas d'intoxication massive car celle-ci nécessite une logistique importante en ce qui concerne le matériel (ventilateurs, bouteilles d'oxygène,…) et le personnel médical. Ainsi, la prise en charge de 100 blessés nécessiterait, sur le terrain, 120 000 litres d'oxygène pour 2 heures de ventilation, soit 200 bouteilles et 100 ventilateurs (Bismuth 1993).

Le traitement anticonvulsivant, indispensable lors d'une intoxication par neurotoxiques organophosphorés, repose sur l'utilisation de benzodiazépines. Cette classe de médicaments psychotropes est employée, usuellement, pour leurs propriétés hypnotiques, anxiolytiques, antiépileptiques, amnésiantes et myorelaxantes ou afin de provoquer un état de sédation. Les benzodiazépines agissent comme modulateurs allostériques positifs dans la neurotransmission GABAergique. Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur qui, en se fixant sur les récepteurs ionotropes $GABA_A$, permet l'ouverture des canaux ioniques Cl^-. Ce flux d'ions provoque un effet inhibiteur au niveau du système nerveux central. Les benzodiazépines, en se fixant sur un site différent du GABA sur les récepteurs $GABA_A$, augmentent l'affinité du GABA pour son récepteur et donc, potentialise son action. Le diazépam (Valium®) est l'anticonvulsivant de référence. Il a un effet préventif des crises convulsives induites par les neurotoxiques OP mais il est sans action curative sur la crise déclarée. D'autres benzodiazépines (loprazolam, clonazépam, midazolam) peuvent également être utilisées. La kétamine (Kétalar®) présente un intérêt particulier en cas d'intoxication aux OP (Riotte, Vacquier *et al.* 1988). Elle aurait une action anticonvulsivante spécifique, prévenant la survenue de lésions neurologiques irréversibles (Puu 1988 ; Dorandeu, Lallement *et al.* 2003) (Cowper and Davidson 1943). De plus, elle possède une AMM et est couramment utilisée en clinique.

Enfin, l'intoxication aux OP peut entrainer une défaillance hémodynamique (Delvallee, Nigong *et al.* 1991). Cette faillite du système cardiovasculaire empêche le maintien d'une pression et d'un débit sanguins adéquats, entrainant une souffrance des organes. Un remplissage vasculaire de sérum salé toutes les 20 minutes est recommandé (Eddleston, Dawson *et al.* 2004) (Eddleston, Buckley *et al.* 2008). Les troubles du rythme et de conduction sont pris en charge, soit par des

traitements classiques (lidocaïne), soit par le sulfate de magnésium (Pajoumand, Shadnia *et al.* 2004).

2-3. Les traitements spécifiques

Les traitements spécifiques visent le système cholinergique. L'**atropine** est un antagoniste cholinergique qui agit en se fixant aux récepteurs muscariniques de l'acétylcholine dans le système nerveux central et périphérique. Elle traite le bronchospasme et l'hypersécrétion bronchique et participe à l'amélioration clinique. Néanmoins, elle n'a aucune action sur les récepteurs nicotiniques donc sur l'atteinte neuromusculaire. L'emploi complémentaire d'antidotes spécifiques des cholinestérases est alors indispensable. Les **oximes** réagissent avec le groupement phosphyle au niveau du site actif de l'enzyme afin de la libérer. Le *sulfate de pralidoxime* (Contrathion®) est le produit le plus souvent utilisé en France dans les intoxications par organophosphorés. Néanmoins, aucune oxime existante à ce jour n'est efficace contre tous les neurotoxiques organophosphorés.

Jusqu'en 1993, les forces de l'armée française utilisaient un traitement par seringue auto-injectable tri-compartimentée (Multipen® auto-injector), commercialisée par la firme hollandaise Duphar (figure 21). Cette seringue contenait 2 mg de sulfate d'atropine, 7.5 mg de diazepam et 350 mg de méthylsulfate de pralidoxime. Chaque combattant possédait deux injecteurs de ce type. Cette thérapeutique est d'une grande efficacité si elle est utilisée dès les premières minutes qui suivent l'intoxication. Des études ont montré que l'administration de deux auto-injecteurs permet la survie du singe *Cynomolgus* intoxiqué avec 8 DL_{50} de soman (Lallement, Veyret *et al.* 1997). Depuis 2008, un nouvel auto-injecteur bi-compartimenté est employé, le diazépam ayant été remplacé par 20 mg de chlorhydrate d'avizafone, sa pro-drogue (figure 21). Cet auto-injecteur Ineurope® est fabriqué par la Pharmacie Centrale des Armées (Rousseau, Besse Bardot *et al.* 2009). D'autres changements ont été et sont encore envisagés notamment dans le remplacement du pralidoxime par une autre oxime, le HI-6.

auto-injecteur Multipen® Duphar

auto-injecteur Ineurope®

Figure 21 : Seringues auto-injectables tri-compartimentée Multipen® Duphar et bi-compartimentée Ineurope®
(source : http://www.usammda.army.mil/fielded/marki.html et (Rousseau, Besse Bardot et al. 2009))

2-4. Le développement des oximes (figure 22)

Une étude réalisée au Sri Lanka en 1991 lors d'une pénurie de pralidoxime (**2-PAM**) a montré que le traitement d'intoxications modérées à sévères par l'atropine seule avait la même efficacité en terme de mortalité, de durée de ventilation ou d'hospitalisation que le traitement classique par l'association atropine-pralidoxime (de Silva, Wijewickrema *et al.* 1992). Le 2-PAM a été le premier réactivateur des ChEs utilisé chez l'Homme intoxiqué par les OP. Plus de 1 500 composés ont été testés mais seulement quelques uns ont été étudiés pour un usage chez l'Homme. Ainsi, à la fin des années 50, le **TMB-4** (trimedoxime) puis son analogue **MMB-4** (methoxime), formés sur la base d'un bispyridinium, apparaissent plus efficaces que le 2-PAM, vis à vis du tabun (Kuca, Cabal *et al.* 2005) pour le premier et vis à vis du sarin et même du soman pour le second (Bajgar, Patocka *et al.* 1975 ; Harris, Anderson *et al.* 1990). Au début des années 60, un analogue structural du TMB-4 fait son apparition, l'**obidoxime** (Luettringhaus and Hagedorn 1964). Ce composé est commercialisé sous le nom de Toxogonine® et semble le plus efficace contre les insecticides organophosphorés (Thiermann, Szinicz *et al.* 1999). Malheureusement, il reste sans effet contre le soman. Puis, vint le tour des oximes bispyridinium asymétriques. Hagedorn développa de nombreux composés de la série des H-oximes avec notamment **HI-6** (Oldiges and Schoene 1970) et **HLö-7** (Eyer, Hagedorn *et al.* 1992) qui sont largement plus efficaces que leurs prédécesseurs. A l'heure actuelle, le développement d'oximes, plus efficaces, moins toxiques et passant la BHE (Demar, Clarkson *et al.* 2010) (Garcia, Campbell *et al.* 2010), reste un enjeu considérable. Les intoxications au soman et au tabun, on le verra par la suite, « résistent » toujours aux oximes existantes.

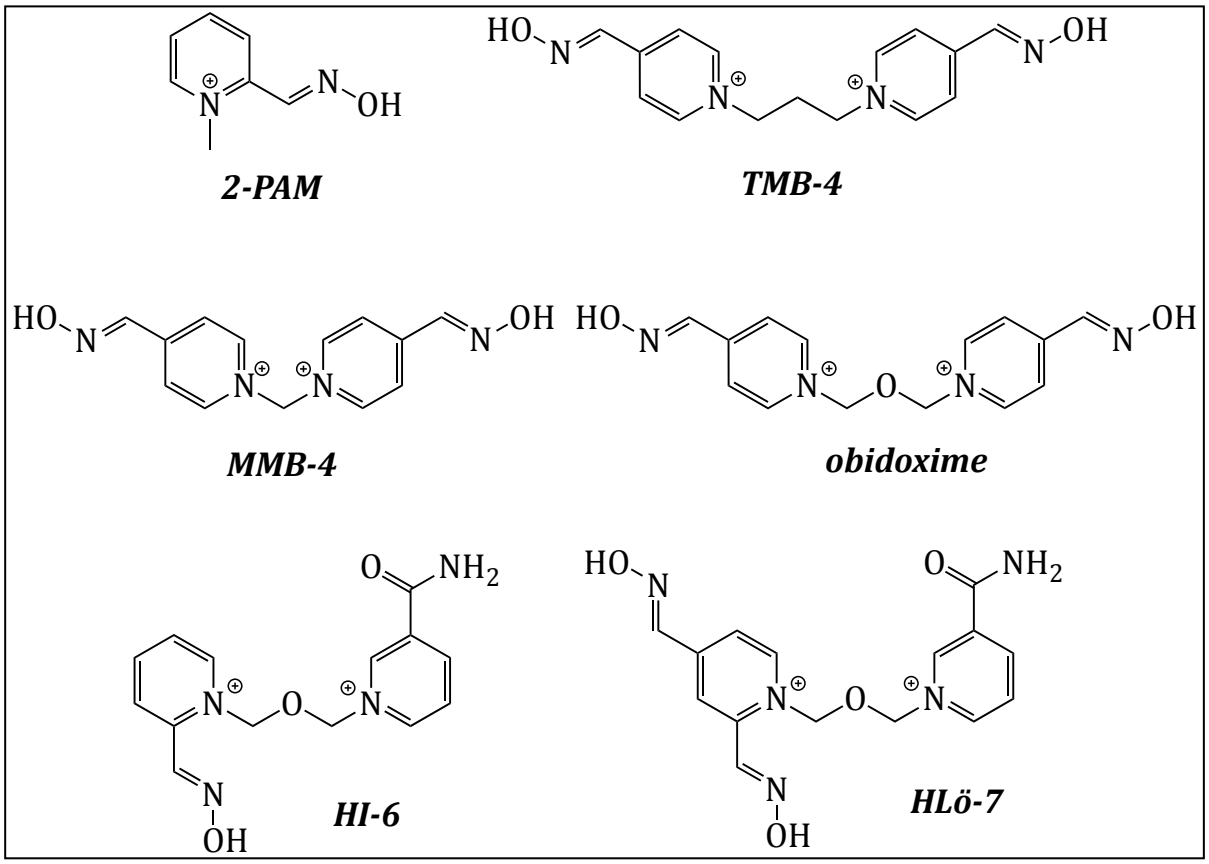


Figure 22 : Structures chimiques de quelques oximes.

2-4-1. Le mécanisme d'action des oximes

Le mécanisme d'action des oximes a été très étudié depuis les années 60 (Su, Wang *et al.* 1986 ; Wong, Radic *et al.* 2000 ; Worek, Szinicz *et al.* 2005 ; Bajgar, Kuca *et al.* 2007 ; Maxwell, Koplovitz *et al.* 2008 ; Luo, Chambers *et al.* 2010). La réaction de réactivation (schéma 23) est une attaque nucléophile de l'ion oximate sur le phosphore de l'adduit formant un état de transition où le phosphore est pentacoordiné, suivi d'un départ de la phosphyloxime avec libération de l'hydroxyle de la sérine catalytique. A ce jour, il n'est pas établi que l'attaque de l'oximate se fasse par la face opposée à la sérine, ou par une face adjacente (Nachon, Carletti *et al.* 2010).

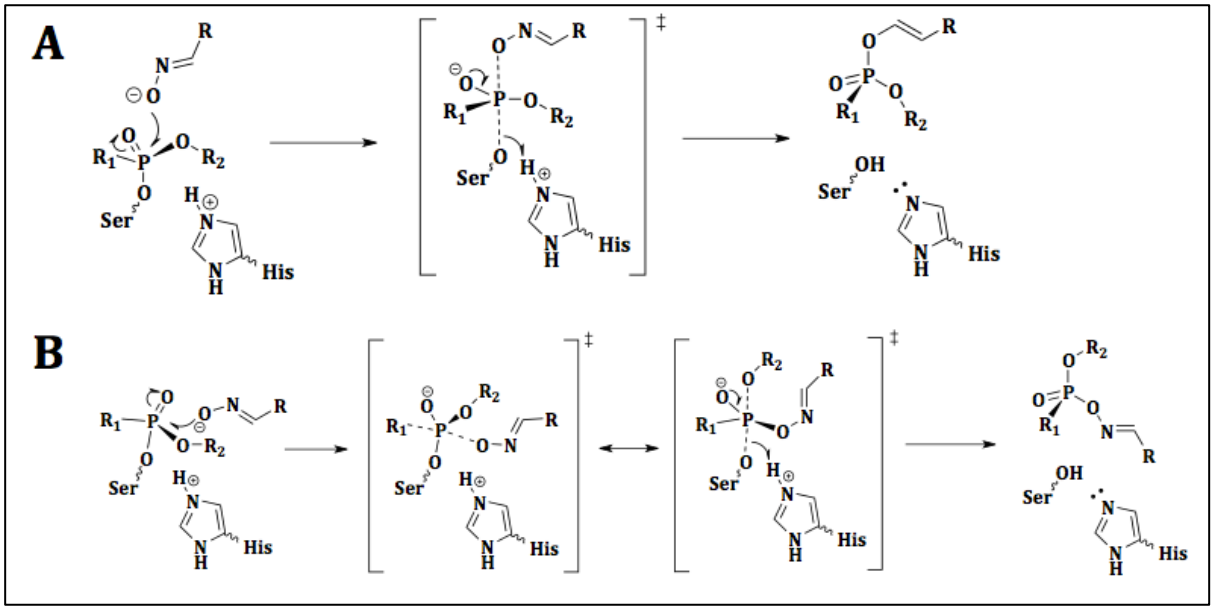


Schéma 23 : Mécanisme de réactivation des ChEs par les oximes avec attaque par la face apicale (A) ou par une face adjacente (B) à la sérine (Nachon, Carletti et al. 2010).

L'efficacité d'une oxime est dépendante de plusieurs facteurs. Diverses études ont permis de comprendre l'orientation de l'oxime dans la gorge, les résidus du site catalytique mis en jeu (Ashani, Radic *et al.* 1995), l'influence de la structure de l'OP fixé dans le site actif ainsi que celle de l'oxime. En effet, des études de mutagénèse ont montré que l'encombrement stérique dans la gorge est le facteur limitant de la réaction de réactivation par les oximes (Wong, Radic *et al.* 2000 ; Maxwell, Koplovitz *et al.* 2008). Ainsi, certaines se fixent au niveau de la poche « choline » (Trp84 chez la *Tc*AChE) telles que le 2-PAM (figure 24) et leur orientation est alors dépendante de la taille du groupement alkyle de l'OP fixé sur la sérine catalytique. D'autres, comme le HI-6 ou l'obidoxime, se fixent au niveau du site périphérique, grâce à leur deuxième groupement pyridinium (stacking de noyaux aromatiques) (Maxwell, Koplovitz *et al.* 2008). L'encombrement stérique de l'OP influence donc moins leur efficacité (Ekstrom, Pang *et al.* 2006). D'après la structure cristallographique du complexe mAChE-HI-6 (figure 24), le HI-6 est stabilisé par plusieurs liaisons hydrogène à l'intérieur du site actif. Celle située entre l'oxygène liant les deux noyaux pyridinium du HI-6 et Asp74 semble essentielle, car une substitution de cet oxygène par un groupement méthylène diminue nettement son efficacité de réactivation pour l'enzyme (Luo, Leader *et al.* 2003).

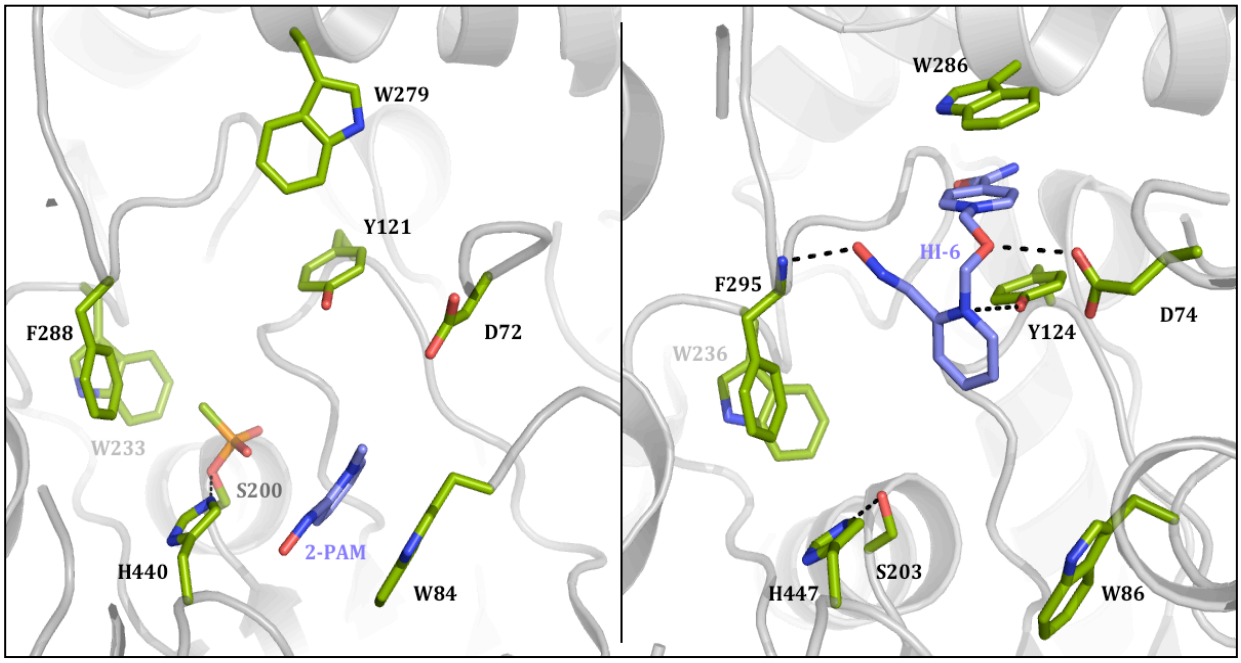


Figure 24 : Structures cristallographiques de la TcAChE inhibée par le soman (vieillie) et en interaction avec le 2-PAM (à gauche)(code pdb : 2WG1) (Sanson, Nachon et al. 2009) et de la mAChE interagissant avec le HI-6 (à droite)(code pdb : 2GYU) (Ekstrom, Pang et al. 2006).

Afin de comparer les efficacités de réactivation des oximes en fonction de la nature de l'OP lié au site catalytique de l'AChE, un modèle cinétique de la réaction de réactivation est nécessaire. Le modèle le plus simple est le suivant :

$$[EP] + [Ox] \underset{}{\overset{K_D}{\rightleftharpoons}} [EP\text{-}Ox] \xrightarrow{k_r} [E] + [P\text{-}Ox]$$

où [EP] est l'enzyme phosphylée ; [Ox] est l'oxime ; [EP-Ox] est le complexe réversible enzyme phosphylée – oxime ; [E] est l'enzyme libérée et [P-Ox] et l'oxime phosphylée.

La constante de dissociation K_D du complexe [EP-Ox] représente l'affinité de l'oxime pour l'enzyme phosphylée et k_r est la constante de déphosphylation de l'enzyme. Le rapport k_r/K_D, que l'on notera k_{r2}, est la constante bimoléculaire de réactivation et représente l'efficacité de l'oxime pour la réactivation de l'enzyme. Le tableau 25 et la figure 26 regroupent les constantes de la réaction de réactivation d'oximes vis à vis de l'hAChE inhibée par différents OP.

OP	Oxime	K_D (µM)	k_r (min^{-1})	k_{r2} ($mM^{-1}.min^{-1}$)	référence
VX	2-PAM	28	0,2	7,7	
	obidoxime	27	0,9	32,6	(Worek, Reiter *et al.* 2002)
	HI-6	11	0,2	21,0	
	Hlö-7	8	0,5	63,2	
	MMB-4	1196	1, 6	1,3	(Worek, Wille *et al.* 2010)
	TMB-4				
VR	2-PAM	31	0,1	2,0	
	obidoxime	106	0,6	5,9	(Worek, Thiermann *et al.*
	HI-6	9	0,7	77,2	2004)
	Hlö-7	5	0,8	158,5	
	MMB-4	574	4,0	7,0	(Worek, Wille *et al.* 2010)
	TMB-4				
sarin	2-PAM	28	0,35	9,1	
	obidoxime	31	0,9	30,0	(Worek, Reiter *et al.* 2002)
	HI-6	50	0,7	13,5	
	Hlö-7	24	0,8	35,1	
	MMB-4	1544	1,9	1,2	(Worek, Wille *et al.* 2010)
	TMB-4				
cyclosarin	2-PAM	3159	0,2	> 0,1	(Worek, Eyer *et al.* 1998)
	obidoxime	946	0,4	0,4	
	HI-6	47	1,3	27,5	(Worek, Reiter *et al.* 2002)
	Hlö-7	18	1,7	92,9	
	MMB-4	2467	4,5	1,8	(Worek, Wille *et al.* 2010)
	TMB-4	132	0,1	0,1	(Worek, Eyer *et al.* 1998)
tabun	2-PAM	706	> 0,1	> 0,1	
	obidoxime	97	> 0,1	0,4	(Worek, Thiermann *et al.*
	HI-6	*n.d*	*n.d*	*n.d*	2004)
	Hlö-7	107	> 0,1	0,2	
	MMB-4	2418	> 0,1	> 0,1	(Worek, Wille *et al.* 2010)
	TMB-4	490	0,2	0,3	(Calic, Vrdoljak *et al.* 2006)

Tableau 25 : Constantes de réactivation de quelques oximes vis à vis l'AChE humaine érythrocytaire inhibée par différents OP. *K_D est la constante de dissociation du complexe [EP-Ox] ; k_r est la constante de vitesse de déphosphylation du complexe [EP-Ox] et k_{r2} est la constante bimoléculaire de réactivation représentant l'efficacité de l'oxime. (n.d signifie qu'il n'y a pas réactivation).*

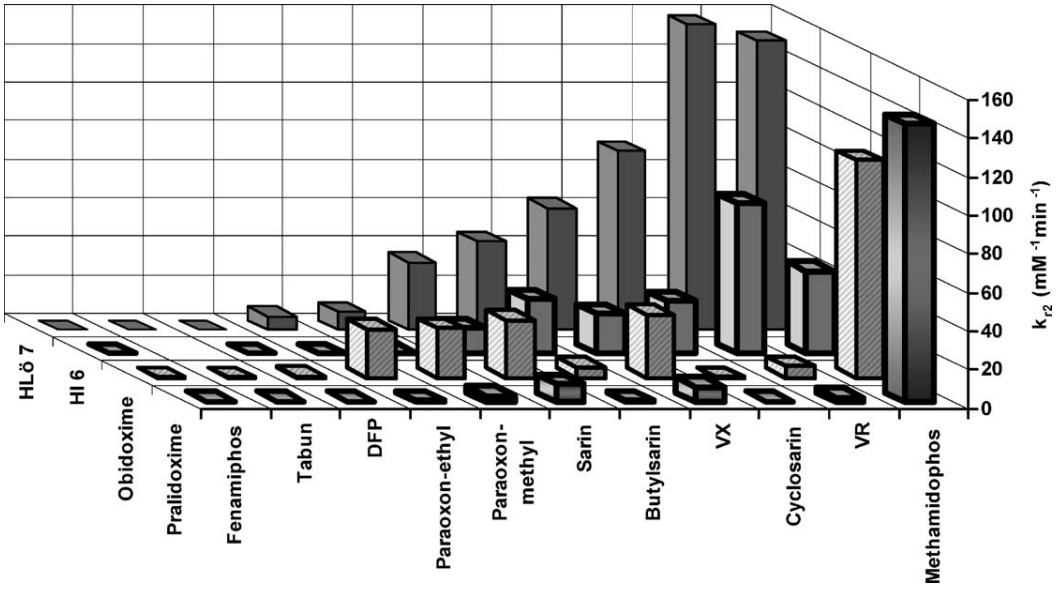


Figure 26 : Diagramme comparatif de l'efficacité de réactivation de certaines oximes vis à vis de l'hAChE inhibée par différents OP (Worek, Thiermann et al. 2004).

Le problème de la toxicité de ces oximes libres (avant la réaction de déphosphylation) et phosphylées (après réactivation de l'enzyme) est également posé. En effet, il s'est avéré que la phosphyloxime pouvait être plus inhibitrice que l'OP ayant formé l'adduit et sur lequel l'oxime a réagi (Luo, Saxena *et al.* 1999 ; Worek, Eyer *et al.* 2000 ; Ashani, Bhattacharjee *et al.* 2003). Cependant la ré-inhibition de l'AChE par les phosphyloximes ne dépend pas de leur pouvoir inhibiteur mais de leur stabilité car elles subissent une dégradation non-enzymatique (Becker, Kawan *et al.* 1997 ; Becker, Kawan *et al.* 2007). Il a été montré que les phosphyloximes avec un cycle pyridinium substitué en position 2 (2-PAM, HI-6, HLö-7) sont instables, alors que les phosphyloximes avec un pyridinium substitué en position 4 (obidoxime, TMB-4, MMB-4) sont très stables (Worek *et al.* 2000, Kiderlen *et al.* 2005). La formation d'une phosphyloxime stable avec l'obidoxime, le TMB-4 et le MMB-4 nuance donc l'intérêt de la réactivation de l'AChE par ces composés (Becker, Worek *et al.* 2010). Néanmoins, *in vivo*, la phosphyloxime peut subir une hydrolyse par les enzymes plasmatiques (Kiderlen, Worek *et al.* 2000).

2-4-2. Les limites imputées aux oximes

2-4-2-1. Limites dans le choix du modèle d'étude

Les essais cliniques sur le modèle humain sont éthiquement interdits. Le modèle animal (Dawson 1994) reste le modèle de choix pour les études de réactivation des cholinestérases par les oximes (souris, rat, cobaye, porc, singe,…).

In vitro, les études montrent une différence significative de réactivation de l'AChE selon les espèces animales mais également entre les enzymes animales et humaines (de Jong and Wolring 1984 ; Worek, Reiter *et al.* 2002 ; Worek, Eyer *et al.* 2007 ; Worek, Aurbek *et al.* 2011). L'extrapolation à l'Homme des résultats obtenus sur le modèle animal reste délicate.

L'Homme ne possédant pas de carboxylestérases, le cobaye est le modèle rongeur qui s'en rapproche le plus. En effet, la présence de ces enzymes chez les autres rongeurs (rat, souris,…) interfèrent dans les mécanismes de réactivation mis en jeu. Néanmoins, les études comparatives de réactivation entre le cobaye et l'Homme montrent des différences significatives où la réactivation chez le modèle humain est largement plus rapide (Luo, Tong *et al.* 2007). Ainsi, des réactivateurs potentiellement efficaces chez l'Homme pourraient être prématurément éliminés lors d'un criblage chez le cobaye. Des modèles humanisés de souris dépourvus de carboxylestérase semblent un meilleur compromis (Duysen, Koentgen *et al.* 2011), et nous envisageons de construire une lignée dont le gène murin de l'AChE a été remplacé par le gène humain.

Parallèlement aux modèles rongeurs, des modèles de « gros » mammifères ont été développés, notamment le porc et le singe. Leur taille permet le suivi d'un grand nombre de paramètres physiologiques et biochimiques. Les résultats des études de cinétiques chez le porc sont très semblables à celles du cobaye (Worek, Aurbek *et al.* 2008 ; Worek, Aurbek *et al.* 2011). Elles peuvent ainsi être une base intéressante à l'extrapolation chez l'Homme. Le singe est également un modèle de choix par ses similitudes avec le modèle humain, que ce soit sur des études de réactivation ou de vieillissement (Luo, Tong *et al.* 2008 ; Worek, Aurbek *et al.* 2011). Malheureusement, l'utilisation de ces modèles est très réglementée et donc contraignante.

2-4-2-2. Limites d'action

Comme pour la pyridostigmine, les oximes existantes sont chargées, ne passent pas la barrière hémato-encéphalique et n'ont donc pas d'action sur les cholinestérases au niveau central. Une des stratégies de développement aujourd'hui est de synthétiser des oximes d'une génération nouvelle, non chargées, pour agir à ce niveau (Kalisiak, Ralph *et al.* 2011). Ces molécules peuvent, par exemple, être structurées de manière à obtenir une partie affine, se fixant au niveau du site périphérique et d'une partie réactive, au bout d'un bras qui plonge vers l'intérieur de la gorge, jusqu'au site catalytique (de Koning, Joosen *et al.* 2011 ; de Koning, van Grol *et al.* 2011 ; Mercey, Verdelet *et al.* 2011).

2-4-2-3. Le tabun

Les études sur la réactivation des cholinestérases inhibées par le tabun et ses analogues sont nombreuses. En effet, sa résistance aux oximes le rend redoutable (Worek, Aurbek *et al.* 2007). Les premières études structurales sur l'AChE murine mettaient en cause un positionnement de la Phe338 empêchant l'accessibilité de la sérine phosphylée par l'HI-6, d'où son inefficacité (Ekstrom, Akfur *et al.* 2006) et ce, contrairement aux composés dont la fonction oxime est en position 4 du noyau pyridinium (de Jong, Verhagen *et al.* 1989 ; Cabal, Kuca *et al.* 2004). Néanmoins, ce n'est pas la seule raison de cette faible efficacité de réactivation. Le positionnement des oximes au niveau du site périphérique semble important pour leur réactivité (Artursson, Akfur *et al.* 2009). Une nouvelle génération d'oximes, les K-oximes, apparaissent plus efficaces dans la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun (Kuca and Cabal 2004 ; Kovarik, Vrdoljak *et al.* 2009 ; Berend, Radic *et al.* 2010 ; Kassa, Karasova *et al.* 2011). Ces oximes bispyridinium diffèrent de par le positionnement de la fonction oxime sur le noyau pyridinium et de par la longueur (nombre de carbone) et la nature (absence d'hétéroatomes, présence d'une double liaison) de la chaîne liant les deux noyaux pyridinium. Malheureusement, leur efficacité *in vivo* n'est pas remarquable.

Les structures cristallographiques résolues de la BChE et de l'hAChE inhibées par le tabun (Carletti, Li *et al.* 2008 ; Carletti, Colletier *et al.* 2010) ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition et de vieillissement du complexe enzyme-

tabun et sont la meilleure base pour la conception de réactivateurs plus efficaces ou de mutants d'enzymes réactivables.

2-4-2-4. Le vieillissement de l'acétylcholinestérase

La réaction de vieillissement est également une limite à la réactivation de l'AChE par les oximes. En effet, le conjugué AChE-OP désalkylé est non réactivable du fait de la formation d'un oxyanion (Green and Saville 1956). La charge négative du conjugué alkylphosphonate-AChE va, d'une part, repousser l'ion oximate et d'autre part, diminuer l'électrophilie du phosphore et donc, sa réactivité vis à vis des oximes. De plus, le pont salin formé entre l'imidazolium de l'histidine catalytique et l'oxyanion de l'adduit stabilise fortement le conjugué vieilli (Carletti, Li *et al.* 2008 ; Gabel, Masson *et al.* 2009). En ce qui concerne l'inhibition de l'acétylcholinestérase par le soman, les oximes ont une fenêtre temporelle d'action très limitée car le vieillissement a lieu quelques minutes seulement après l'inhibition (Fleisher and Harris 1965 ; Talbot, Anderson *et al.* 1988).

LES STRATEGIES PROPHYLACTIQUES ET THERAPEUTIQUES ENZYMATIQUES (Masson 2011)

Parallèlement à l'amélioration des oximes dans la prévention et le traitement des intoxications aux OP, les recherches s'orientent vers le développement d'enzymes ayant une action de bioépurateurs. L'épuration par les enzymes consiste à piéger et/ou dégrader l'OP avant qu'il n'atteigne sa cible biologique. Ces enzymes pourraient largement améliorer la protection et la décontamination internes et externes *(Bird, Dawson et al. 2010)*. Deux types d'enzymes sont étudiées : les **bioépurateurs stœchiométriques**, qui piègent spécifiquement et irréversiblement les OP et **catalytiques**, capable d'hydrolyser la liaison phosphoester de l'OP. Ce processus de défense est déjà présent naturellement, la concentration plasmatique de BChE circulante étant suffisante pour protéger le système cholinergique contre de faibles doses d'OP. Par exemple, le CBDP (2-(ortho-crésyl)-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphoran-2-one), qui est un métabolite neurotoxique d'un retardateur de flamme passant parfois accidentellement dans le système de climatisation des cabine d'avions, est rapidement piégé par la BChE endogène (Schopfer, Furlong *et al.* 2010 ; Carletti, Schopfer *et al.* 2011). Mais en cas d'intoxication aigüe, la quantité de BChE endogène est insuffisante. Idéalement, un bioépurateur enzymatique devrait pouvoir protéger contre 5 DL_{50} d'un large spectre d'OP.

Les premiers épurateurs stœchiométriques ont été les cyclodextrines (Desire and Saint-Andre 1986). Ces oligosaccharides cycliques sont des molécules-cage faisant l'objet d'innombrables applications dont la dépollution des sols contaminés par les pesticides. Leur développement en tant qu'épurateur des OP est encore largement d'actualité, puisque, par exemple, des β-cyclodextrines modifiées, récemment développées, se sont montrées capables d'hydrolyser du cyclosarin (Le Provost, Wille *et al.* 2011 ; Muller, Koller *et al.* 2011). Puis, les études ont porté sur les enzymes réagissant spécifiquement avec les OP, la carboxylestérase (Sweeney and Maxwell 2003), l'acétylcholinestérase (Wolfe, Rush *et al.* 1987 ; Doctor, Blick *et al.* 1993 ; Sweeney and Maxwell 2003 ; Lenz, Yeung *et al.* 2007) et la butyrylcholinestérase (Raveh, Grunwald *et al.* 1993 ; Lenz, Yeung *et al.* 2007).

1. La butyrylcholinestérase humaine et ses mutants

Les qualités de bioépurateur d'OP de la butyrylcholinestérase humaine ont été démontrées depuis près de 20 ans (Raveh, Grunwald *et al.* 1993). 200 mg de BChE administrée chez un adulte peut fournir une protection contre 2 DL_{50} de soman sans aucun effet secondaire (Ashani, Grauer *et al.* 1998 ; Ashani and Pistinner 2004). Les recherches actuelles visent à améliorer la production de BChE pour une mise sur le marché en tant que traitement prophylactique.

Plusieurs procédés existent. La BChE plasmatique purifiée dispose d'une stabilité au niveau circulatoire d'environ 1 semaine et son administration n'entraine pas d'effet secondaire toxique (Genovese, Sun *et al.* 2010 ; Saxena, Sun *et al.* 2011). Les essais cliniques de phase I ont été complétés avec succès en 2010. Comme les phases II et III ne sont pas réalisables pour des raisons d'éthique, mais que l'efficacité a été démontrée sur 2 mammifères (« animal rules »), la BChE de plasma est passée au stade de développement avancé (diTargiani, Chandrasekaran *et al.* 2010). Mais le coût de production est très élevé, environ 10 k€/dose de 200 mg (Source Charles Millard, USAMRICD). Afin de réduire les coûts, la production de cholinestérases recombinantes dans le lait de chèvre transgénique (Huang, Huang *et al.* 2007) ou dans le tabac (Geyer, Kannan *et al.* 2010) a été mise au point. Mais ces enzymes recombinantes sont imparfaitement glycosylées, ce qui a pour conséquence de réduire leur temps de résidence moyen dans la circulation sanguine à environ 7 heures, réduisant leur potentiel prophylactique et réduisant la durée d'efficacité thérapeutique. Cependant, une PEGylation permet d'améliorer le temps de résidence moyen à environ 40 heures. C'est d'ailleurs sous la forme PEGylée que la BChE devrait être commercialisée sous le nom de Protexia®.

Bien qu'efficace, la quantité importante de BChE requise en raison du caractère stœchiométrique de la réaction avec les OP (une molécule de BChE capte une molécule d'OP) est un facteur limitant l'usage de l'enzyme. Une solution est de modifier l'enzyme pour qu'elle soit capable de se régénérer spontanément rapidement et puisse réagir avec de nouvelles molécules d'OP. L'enzyme modifiée acquiert des propriétés OP hydrolase et devient alors un bioépurateur catalytique. Le choix de BChE plutôt que la hAChE, quant à l'obtention d'une hydrolase de toxiques organophosphorés, est dû à son site actif moins sélectif, acceptant donc un plus grand panel de ligands, et à sa présence au niveau plasmatique en quantité

importante. De plus, des mutants naturels de BChE existent chez l'Homme sans pour autant que cela n'entraîne de pathologie. C'est ainsi qu'est venue l'idée d'introduire des résidus nucléophiles supplémentaires dans le site actif de la BChE dont il était attendu qu'ils puissent favoriser la déphosphylation rapide de la sérine. En particulier, l'introduction d'une histidine au niveau du trou oxyanion en position 117 (mutant G117H) fut un succès (Millard, Lockridge et al. 1995) (Lockridge, Blong et al. 1997). Chez l'insecte *Lucilia cuprina*, c'est d'ailleurs la mutation en position homologue, G137D qui confère à cette mouche une résistance aux toxiques organophosphorés (Newcomb, Campbell et al. 1997). Le mutant G117H est capable de se réactiver après inhibition par des neurotoxiques organophosphorés (échothiophate, VX, sarin, DFP) avec des vitesses 100 à 2000 fois plus importantes que pour la BChE sauvage, d'environ 1 minute pour l'échothiophate à 1 heure pour le VX (Broomfield, Lockridge et al. 1999). Sa vitesse d'inhibition par les OP est généralement diminuée d'environ un facteur 1000 et l'hydrolyse de l'acétylthiocholine et de la butyrylthiocholine ne sont pas ou peu affectées (Lockridge, Blong et al. 1997).

En cas de vieillissement rapide comme c'est le cas pour le soman, la déphosphylation est comparativement trop lente et aucune réactivation n'est mesurable. Il est toutefois possible de ralentir fortement la vitesse de vieillissement en remplaçant l'acide glutamique en position 197 par une glutamine, cette dernière étant incapable de stabiliser le carbocation intermédiaire formé au cours de la désalkylation du groupement pinacolyle. Effectivement, pour le double mutant G117H/E197Q, la vitesse de vieillissement devient suffisamment faible pour que celui-ci soit capable de se réactiver spontanément entre 8 minutes et moins de 3 heures après inhibition par le soman, selon le diastéréoisomère impliqué (Millard, Lockridge et al. 1998). Malheureusement, l'activité catalytique de ce double mutant est abaissée pour les autres OP, et il ne présente finalement pas d'intérêt thérapeutique (Masson and Lockridge 2010). De nombreuses autres mutations ont été évaluées, mais aucune ne présentait de meilleure vitesse d'hydrolyse que le mutant G117H (Masson, Nachon et al. 2008).

2. L'acétylcholinestérase humaine (hAChE) et ses mutants

L'acétylcholinestérase, étant la cible physiologique des OP, elle est tout de suite apparue comme un bioépurateur de choix (Wolfe, Rush *et al.* 1987). L'administration d'AChE recombinante produite en cellules bactériennes ou en cellules de mammifères entraine un temps de résidence de l'enzyme plus court que celui de l'AChE plasmatique, de 4 minutes à 2h30 suivant le degré de sialylation naturelle des glycanes. L'optimisation des modifications post-traductionnelles (glycosylation, tétra-oligomérisation et surtout PEGylation , …) améliore largement ce temps, jusqu'à plus de 30 heures de demi-vie de l'enzyme dans la circulation sanguine (Kronman, Velan *et al.* 1995 ; Saxena, Ashani *et al.* 1998 ; Cohen, Kronman *et al.* 2006).

La stéréosélectivité de l'AChE vis à vis des différents OP est logiquement optimum comparée à celle de la BChE et souvent, la vitesse d'inhibition est aussi supérieure. Par exemple, des études ont montré que l'hAChE réagit 4 fois plus rapidement et au moins 10 000 fois plus spécifiquement que la BChE avec l'isomère P_SC_S de soman, le plus toxique (Ordentlich, Barak *et al.* 1999), et qu'en conséquence, elle confère une meilleure protection en cas d'intoxication au soman. C'est le cas également en cas d'intoxication au VX ou au sarin chez la souris (Cohen, Kronman *et al.* 2006).

Des travaux reprenant le concept du mutant G117H de la BChE ont été transposés à l'AChE. L'équivalent du mutant G117H chez l'AChE humaine et l'AChE de serpent *Bungarus fasciatus* (G122H) est inactif, même vis à vis de l'acétylthiocholine, probablement en raison d'un encombrement stérique trop important dans le site moins volumineux des AChEs. Une double mutation (Y124Q/S125T) chez *Bungarus fasciatus* permet toutefois d'élargir le site actif et de retrouver une activité cholinestérasique ainsi qu'une activité OP hydrolase, mais toutes deux sont beaucoup trop faibles pour que ce mutant présente un intérêt pratique (Poyot, Nachon *et al.* 2006). Le double mutant Y124H/Y72D qui introduit une histidine catalytique à une position différente dans le site actif a donné des résultats plus intéressants, la vitesse de réactivation spontanée de ce mutant d'AChE humaine inhibée par le VX est 100 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage (Trovaslet-Leroy, Musilova *et al.* 2011).

D'autres travaux récents sur l'AChE ont porté sur le concept de bioépurateurs pseudo-catalytiques, où l'enzyme est co-administrée avec un réactivateur capable de la régénérer rapidement *in vivo*. Dans ce cas, les optimisations par ingénierie ont porté sur le ralentissement du vieillissement et sur l'augmentation de l'efficacité des réactivateurs. En particulier, par rapport à l'enzyme sauvage, le vieillissement du conjugué soman/F338A-hAChE est 170 fois plus lent (Mazor, Cohen *et al.* 2008) et les conjugués du double mutant F338A/Y337A avec divers OP sont réactivés de 2 à 10 fois plus efficacement par le HI-6 (Cochran, Kalisiak *et al.* 2011).

3. La phosphotriestérase bactérienne (Raushel 2002 ; Raushel 2011)

La phosphotriestérase bactérienne (PTE ; EC 3.1.8.1), isolée à partir de souches, notamment *Pseudomonas diminuta*, fait partie de la famille des amidohydrolases comme une trentaines d'autres enzymes (Holm and Sander 1997). Son rôle physiologique chez la bactérie n'est pas clairement défini et aucun substrat n'a encore été identifié. Néanmoins, il semblerait que la PTE soit une lactonase (Afriat, Roodveldt *et al.* 2006 ; Draganov 2010). Cette métallo-enzyme dimérique de 72 kDa contient deux ions métalliques divalents. Le zinc est le cofacteur naturel de l'enzyme mais peut être remplacé par d'autres métaux comme le cobalt, le cadmium, le manganèse ou le nickel (Omburo, Kuo *et al.* 1992 ; Omburo, Mullins *et al.* 1993). Plusieurs structures cristallographiques ont successivement été résolues (Benning, Kuo *et al.* 1994), impliquant différents ions métalliques (Benning, Kuo *et al.* 1995 ; Benning, Shim *et al.* 2001 ; Grimsley, Calamini *et al.* 2005). Néanmoins, la substitution des ions Zn^{2+} par d'autres ions métalliques modifie l'activité catalytique de l'enzyme (Omburo, Kuo *et al.* 1992 ; Hong and Raushel 1996 ; Krauss 2001). Un mécanisme SN_2 d'hydrolyse a été proposé (Jackson, Foo *et al.* 2008), impliquant une molécule d'eau activée par un des centres métalliques, le second centre étant impliqué dans la stabilisation du phosphodiester et dans la diminution de l'électrophilie du phosphore (Vanhooke, Benning *et al.* 1996 ; Benning, Hong *et al.* 2000 ; Koca, Zhan *et al.* 2003 ; Samples, Raushel *et al.* 2007 ; Wong and Gao 2007 ; Zhang, Wu *et al.* 2009).

La PTE est la cible de nombreuses études car son activité catalytique vis à vis des phosphotriesters (Ghanem and Raushel 2005), tels les pesticides (paraoxon) et

à moindre mesure, les neurotoxiques (tabun, sarin, soman, VX) (Dumas, Durst *et al.* 1990) est très élevée. Par exemple, son efficacité catalytique vis à vis du paraoxon est de l'ordre 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$ (Omburo, Kuo *et al.* 1992). Dans certains cas, comme pour le méthylparaoxon, elle peut être améliorée par évolution dirigée (Cho, Mulchandani *et al.* 2002). Néanmoins, ces principaux défauts pour une action bioépuratrice et/ou décontaminatrice, tiennent de son instabilité en rapport avec la formation de son centre bimétallique (Rochu, Viguie *et al.* 2004 ; Carletti, Aurbek *et al.* 2009), à son immunogénicité potentielle en cas d'usage interne chez l'Homme, ainsi qu'à son manque général de stéréosélectivité vis à vis des énantiomères d'OP les plus toxiques (Chen-Goodspeed, Sogorb *et al.* 2001 ; Li, Lum *et al.* 2001).

Le problème de la stabilité peut être contourné grâce aux homologues thermostables de PTE, comme par exemple l'enzyme isolée de la bactérie hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* (Merone, Mandrich *et al.* 2005 ; Elias, Dupuy *et al.* 2008 ; Del Vecchio, Elias *et al.* 2009 ; Mandrich, Merone *et al.* 2010). D'autres enzymes homologues thermostables ont également été mise en évidence chez d'autres espèces bactériennes (Ghanem, Li *et al.* 2007 ; Hawwa, Aikens *et al.* 2009 ; Hawwa, Larsen *et al.* 2009). Cependant, la stabilité accrue des hyperthermophiles coudoie une faible activité catalytique à température physiologique. Une ingénierie de l'enzyme devient nécessaire pour trouver le meilleur compromis entre stabilité et activité (Merone, Mandrich *et al.* 2010).

Alternativement, la conjugaison avec des groupements méthoxy-polyéthylène glycol (MPEG) améliore nettement la thermostabilité de la PTE mésophile (Jun, Musilova *et al.* 2010 ; Trovaslet-Leroy, Musilova *et al.* 2011). Cette modification chimique a également l'avantage d'allonger le temps moyen de résidence plasmatique de 1 heure pour l'enzyme non modifiée, à 48 heures. Mais la baisse d'immunogénicité reste insuffisante (Harris and Chess 2003 ; Novikov, Grimsley *et al.* 2010). L'énantiosélectivité peut être modifiée par mutation de résidus spécifiques dans le site actif pouvant conduire à des améliorations jusqu'à 3 ordres de grandeur de la vitesse d'hydrolyse de l'énantiomère toxique (Hill, Li *et al.* 2003 ; Nowlan, Li *et al.* 2006 ; Merone, Mandrich *et al.* 2010 ; Tsai, Bigley *et al.* 2010 ; Tsai, Fan *et al.* 2010).

4. La paraoxonase humaine de type 1 (hPON1)

Synthétisée dans le foie, cette enzyme plasmatique calcium dépendante de 44 kDa est associée aux HDL (High Density Lipoprotein) (Gan, Smolen *et al.* 1991 ; Watson, Berliner *et al.* 1995 ; Kuo and La Du 1998). Bien que son nom soit dérivé historiquement de son activité paraoxon hydrolase, il s'agit d'une lactonase (Khersonsky and Tawfik 2005). Les propriétés détoxifiantes de cette enzyme vis à vis des toxiques organophosphorés en font un candidat comme bioépurateur catalytique très prometteur (Lenz, Yeung *et al.* 2007 ; Rochu, Chabriere *et al.* 2007 ; Wang, Yuan *et al.* 2011). Cependant cette enzyme n'est fonctionnelle que dans un environnement complexe (Clery-Barraud, Renault et al. 2009)(Renault, Carus et al. 2010). La structure tridimensionnelle de la hPON1 n'a d'ailleurs pas encore été résolue, principalement en raison de la difficulté de travailler sur l'enzyme isolée de ses partenaires lipoprotéiques (Renault, Chabriere et al. 2006; Rochu, Chabriere et al. 2007; Rochu, Renault et al. 2007). C'est pourquoi l'activité de recherche s'est focalisée sur une forme recombinante chimérique stable de PON1 (rPON1) obtenue par évolution dirigée, à partir de laquelle a été résolue une structure cristallographique (Harel, Aharoni et al. 2004). Par la suite, l'efficacité catalytique de la rPON1 a pu être suffisamment améliorée pour obtenir une activité prophylactique *in vivo* vis à vis du sarin ou encore du soman (Valiyaveettil, Alamneh et al. 2011)(Gupta, Goldsmith et al. 2011). Seulement, la rPON1 diffère de 51 résidus par rapport la hPON1, ce qui entraîne des différences de propriétés fonctionnelles (Otto, Harsch *et al.* 2009 ; Trovaslet-Leroy, Musilova *et al.* 2011) ainsi que des problèmes d'immunogénicité. Il semble donc aujourd'hui indispensable de se refocaliser sur l'enzyme humaine, en particulier sur la résolution de sa structure tridimensionnelle (Otto, Kasten *et al.* 2010) (Suzuki, Stevens *et al.* 2010).

CHAPITRE 2 :

Nouveaux réactivateurs de l'acétylcholinestérase humaine « vieillie »

CONTEXTE

La réactivation de l'hAChE inhibée par une oxime fait partie du protocole thérapeutique couramment employé lors d'intoxications par les OP. Il a été clairement établi que les oximes agissent par attaque de la forme anion oximate nucléophile sur l'atome de phosphore du conjugué cholinestérase-OP. Ensuite, la phosphyloxime est libérée à partir de l'état de transition pentacoordiné, se dissocie de l'enzyme alors réactivée, et s'hydrolyse en général assez rapidement. Pour les neurotoxiques tels que le sarin ou le VX, pour lesquels les adduits dans le site actif de l'enzyme sont relativement stables, la réactivation par les oximes est assez efficace (Marrs, Rice *et al.* 2006). En revanche, pour un certain nombre de neurotoxiques, la réaction secondaire de vieillissement a lieu rapidement après la formation de l'adduit initial. Dans le cas du soman, la vitesse du vieillissement est remarquablement rapide, avec un temps de demi-vie de 3 minutes environ. Jusqu'à présent, aucune oxime n'a été capable de réactiver la forme vieillie de l'hAChE inhibée par les OP en raison de la faible réactivité de l'adduit acide phosphonique. Au cours des dernières décennies, de nouveaux réactivateurs de type oxime ont été synthétisés pour réactiver les conjugués non vieillis, mais aucun nouveau concept de réactivateurs capable de réactiver les conjugués vieillis n'a été proposé.

Notre travail se base sur l'hypothèse que le conjugué enzyme-acide phosphonique chargé peut être converti, par réaction avec un composé électrophile, en conjugué phosphonylé réalkylé, suffisament électrophile pour être réactivable par les oximes existantes. Trois classes de composés sont envisagées : des **agents alkylants** portant uniquement une fonction alkylante (figure 27-A), des **réactivateurs bifonctionnels** portant une fonction alkylante et une fonction oxime (figure 27-B) et des **réactivateurs bifonctionnels** dont la fonction alkylante masque la fonction oxime (figure 27-C). Après une évaluation théorique par modélisation moléculaire, les meilleurs candidats sont synthétisés puis leur activité biologique est évaluée et leur mode de fixation dans l'enzyme vieillie est étudiée par cristallographie aux rayons X.

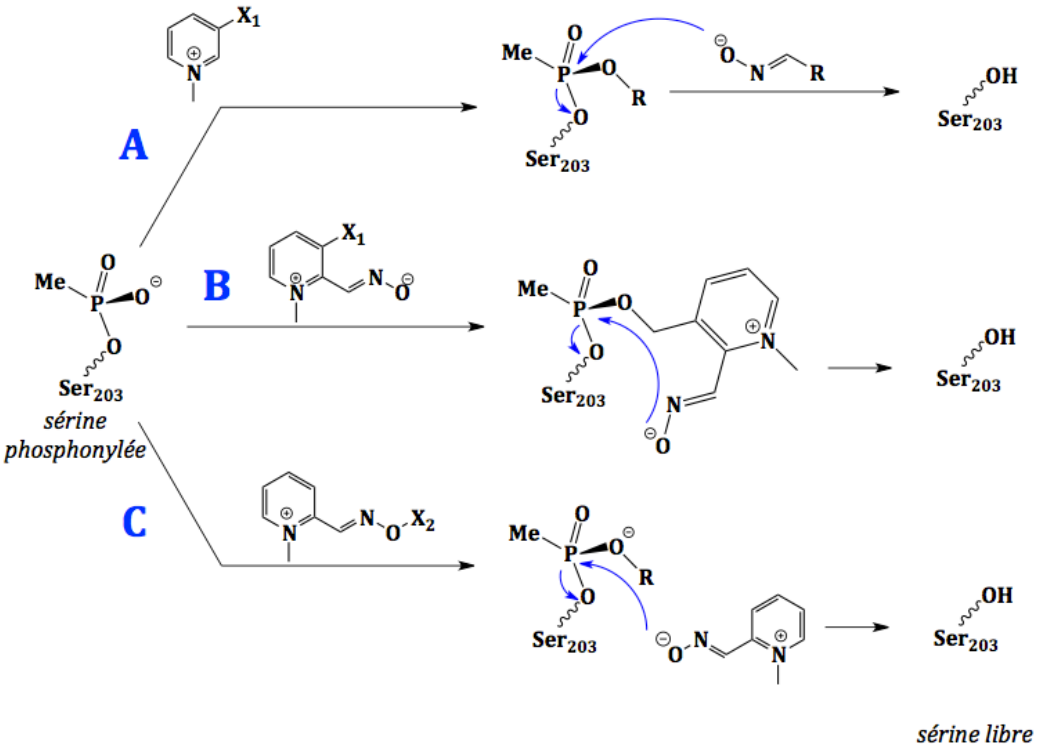


Figure 27 : Stratégies de réactivation de l'hAChE vieillie, soit par l'association d'un agent alkylant simple et d'une oxime existante (A), soit par un réactivateur bifonctionnel portant une fonction alkylante et une fonction oxime sur le même squelette (B) ou portant une fonction alkylante libérant la fonction oxime après alkylation (C). (X_1 et X_2 sont des fonctions électrophiles, e.g. X_1 = CH_2-CO-Br (bromoacétyle) ; X_2 = CF_3 (trifluorométhyle). R est un groupement alkyle)

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Daan Noort du TNO aux Pays-Bas, sur un financement de la Defense Threat Reduction Agency, une agence du département de la défense américaine, chargée de stimuler la recherche dans le domaine de la défense contre les armes chimiques et biologiques.

L'équipe du Dr Noort, constituée de chimistes organiciens et analytiques, a procédé à la synthèse de la majorité des composés ainsi qu'aux premières évaluations biochimiques, consistant à évaluer la capacité d'alkylation de ces composés sur un acide phosphorique simple, en premier lieu, puis sur un peptide phosphonylé modélisant une partie du site actif de l'hAChE, d'autre part, et ce, par diverses techniques de chimie analytique (HPLC, spectrométrie de masse...). Cette partie du projet ne sera décrite ici que succintement dans un souci de comprendre le contexte de ce manuscript.

MODELISATION MOLECULAIRE

Dans cette première étape, nous allons concevoir des composés dont la structure chimique de base permet leur fixation dans le site actif de notre cible, l'acétylcholinestérase humaine, et portant les fonctions nécessaires à la réactivation de l'enzyme après vieillissement. La librairie de ligands générée est évaluée par docking moléculaire.

1. Docking moléculaire

1-1. Généralités

Le docking moléculaire est une méthode d'analyse appartenant au domaine de la modélisation moléculaire. Il permet de prédire l'orientation préférentielle d'une molécule par rapport à une autre, alors que ces deux molécules sont liées et forment un complexe stable (Lengauer and Rarey 1996). Les forces d'interaction entre ces molécules peuvent être estimées et donnent accès à l'énergie de liaison entre les deux molécules. Dans la plupart des cas, le docking moléculaire est utilisé pour prédire l'affinité de liaison d'une petite molécule candidate (médicament,…) dans une molécule cible (protéine,…). Les deux composantes permettant au programme de réaliser le docking sont l'« **espace de recherche** » et la « **fonction d'évaluation** » (Halperin, Ma *et al.* 2002)**.**

1-1-1 L'algorithme de recherche

En théorie, l'espace de recherche se compose de toutes les orientations et conformations possibles de la protéine complexée au ligand. Néanmoins, en pratique, l'exploration exhaustive de tout l'espace de recherche est impossible étant donné le nombre important de distorsions au sein d'une protéine et le nombre possible de rotations et translations d'un ligand par rapport à son récepteur. La plupart des programmes échantillonnent l'espace de recherche avec une efficacité optimale, prenant en compte la flexibilité du ligand et parfois même celle du récepteur. Chaque « snapshot » est référencé comme étant une pose.

AutoDock (Goodsell, Morris *et al.* 1996) (Morris, Huey *et al.* 2008) est un programme de docking utilisant un algorithme génétique, qui permet l'exploration d'un important espace conformationnel, en représentant chaque arrangement spatial du complexe « récepteur-ligand » comme un gène possédant une énergie

particulière. L'ensemble du génome représente donc l'espace de recherche à explorer. Chaque conformation du ligand dans chaque conformation du récepteur peut être évaluée énergétiquement. Néanmoins, notre utilisation d'AutoDock implique que le récepteur (la protéine) reste fixe alors que le ligand est mobile et s'ajuste à son site de liaison au sein du récepteur. Plusieurs essais sont nécessaires afin d'obtenir des résultats fiables. Enfin, il est possible de limiter l'exploration en localisant une zone d'intérêt du récepteur, le site actif, par exemple.

1-1-2. La fonction d'évaluation

En modélisation moléculaire, la fonction d'évaluation est une méthode mathématique approximative permettant de prédire la force d'une interaction non covalente, et donc une affinité de liaison entre deux molécules. Cette méthode se base sur des champs de force en mécanique moléculaire afin d'estimer l'énergie de chaque pose et ainsi d'évaluer la probabilité de celle-ci à représenter une interaction favorable. Une énergie négative indique que la formation du complexe est favorable. Plus l'énergie est faible, plus la force d'interaction et donc, l'affinité est grande.

1-2. Expérimentation

Les calculs de docking ont été réalisés à l'aide du logiciel Autodock VINA 1.0 développé au Scripps Research Institute (http://vina.scripps.edu) (Trott and Olson 2010). Ce programme est destiné au screening de ligands et à la modélisation moléculaire. Une zone d'exploration est généralement centrée sur le site de liaison connu du récepteur, mais peut englober la protéine entière. Cette zone a la forme d'un cube et est caractérisée par les coordonnées tridimensionnelles de son centre et la longueur de ses arêtes. Une grille de potentiel d'interaction pour chaque type d'atome est calculée dans cette zone. La finesse de la grille est définie par l'utilisateur (par exemple, 1 point tous les 0.25 Å). Les résultats se présentent sous la forme d'une liste de conformations/orientations du ligand les plus énergétiquement favorables et dont les énergies de liaison sont exprimées en $kcal.mol^{-1}$ (variation de l'énergie libre de liaison, ΔG). Cette énergie peut être convertie en constante de dissociation du complexe récepteur-ligand. En effet, pour un complexe réversible dont la constante de dissociation est Kd :

$$Re + L \underset{}{\overset{K_D}{\rightleftharpoons}} Re\text{-}L$$

avec Re, le récepteur ; L, le ligand ; Re-L, le complexe récepteur-ligand ; Kd, la constante de dissociaton du complexe récepteur-ligand.

La variation d'énergie libre de liaison **ΔG** du complexe est corrélée à la constante de dissociation $\mathbf{K_D}$ de ce même complexe selon la formule :

$$\Delta G = -RT \cdot \ln(K_D)$$

avec ΔG, la variation de l'énergie libre exprimée en kcal.mol^{-1}; R, la constante des gaz parfaits (1,937 cal.mol^{-1}.K^{-1}) ; T, la température exprimée en Kelvin (25°C soit 298 K) et K_D, la constante de dissociation du complexe récepteur-ligand exprimée en M.

Soit :

$$K_D = e^{\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)}$$

Lorsque la valeur absolue de la variation de l'énergie libre ΔG augmente, la constante de dissociation du complexe récepteur-ligand diminue proportionnellement, ce qui informe sur l'augmentation de l'affinité du ligand pour le récepteur (tableau 28).

ΔG (kcal.mol^{-1})	**K_d (M)**	**Ordre de grandeur**
-1	0,2	dizaine de mM
-2	3,2 10^{-2}	
-3	5,7 10^{-3}	mM
-4	1,0 10^{-3}	
-5	1,8 10^{-4}	dizaine de µM
-6	3,3 10^{-5}	
-7	5,9 10^{-6}	µM
-8	1,0 10^{-6}	
-9	1,9 10^{-7}	dizaine de nM
-10	3,4 10^{-8}	

*Tableau 28 : Correspondance entre variation d'énergie libre (**ΔG**) et constante de dissociation (**K_D**)*

2. Préparation des ligands candidats

2-1. Choix de la fonction électrophile alkylante

2-1-1. Généralités

La réaction est une réaction au cours de laquelle un groupement alkyle se substitue à un hydrogène (schéma 30).

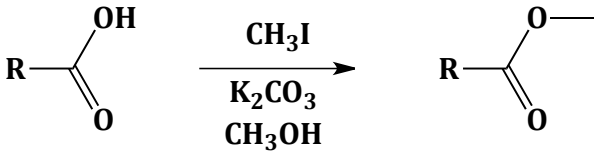


Schéma 30 : Alkylation d'une fonction carboxylique par le iodure de méthyle (CH_3I) en présence d'une base (K_2CO_3 : carbonate de potassium ; CH_3OH : méthanol)

Les agents alkylants sont nombreux et largement utilisés en chimie et en biologie. En effet, les groupements alkyles sont très communs dans le milieu biologique et l'alkylation reste une des manières les plus simples de modifier une molécule. Dans le traitement du cancer, l'utilisation d'agents alkylants anti-néoplasiques (ex : cisplatine, ifosfamide) permet d'alkyler les guanines dans la double hélice d'ADN. Les deux brins ne peuvent se dérouler, entrainant une incapacité de la cellule à répliquer son ADN. La croissance des cellules tumorales est alors stoppée.

Les cibles potentielles d'un agent alkylant sont nombreuses. La chimie actuelle est capable de sélectionner une cible spécifique pour l'alkylation. Notre intérêt, dans cette étude, porte sur les composés capables d'alkyler une fonction phosphonate qui est le type d'adduit rencontré dans l'enzyme vieillie. De plus, l'environnement réactionnel lors de cette alkylation est un site actif enzymatique. Il est donc nécessaire que la réaction d'alkylation puisse être réalisable en milieu aqueux, dans des conditions peu drastiques et dans un délai raisonnable. De ce fait, certains agents alkylants connus comme le diazométhane capable d'estérifier les phosphonates (Joly and Jacobsen 2004) ou le iodure de méthyle, largement utilisé pour les réactions d'alkylation (Skwarczynski and Kafarski 1995), ont dû être éliminés des candidats potentiels d'agents alkylants dans des conditions biologiques.

Au final, plusieurs types d'entités chimiques se sont révélés appropriés à la poursuite de notre objectif (figure 31).

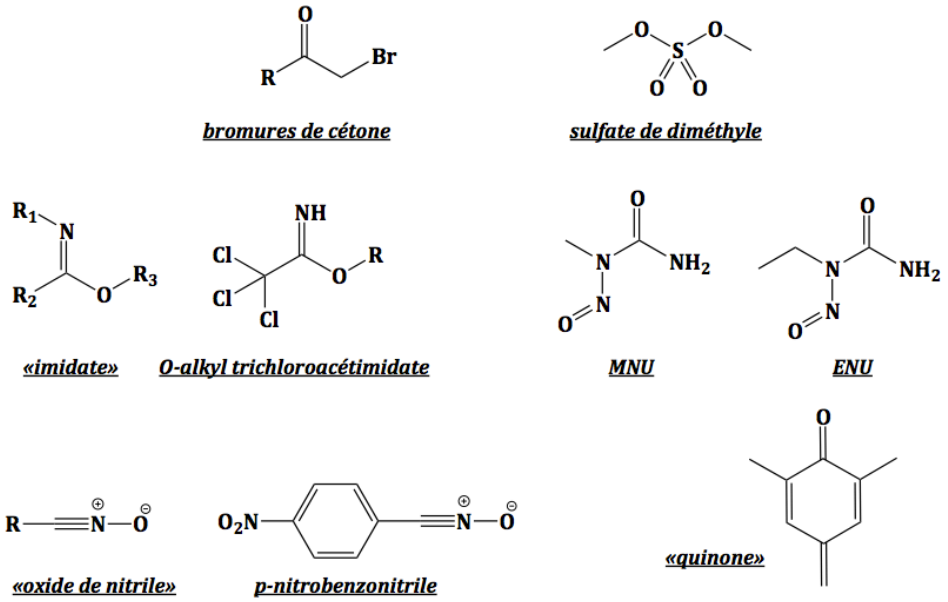


Figure 31 : Structure chimique d'entités potentiellement exploitables en tant qu'agents alkylants de groupements phosphates, phosphonates et phosphoesters.

Les bromures de cétone sont largement décrits dans les réactions d'alkylation d'acides phosphorique. Ces composés ont l'avantage, essentiel dans notre contexte, d'être réactifs en milieu aqueux (Lherbet, Castonguay *et al.* 2005).

Le sulfate de diméthyle est un réactif d'alkylation polyvalent car il est capable de méthyler tant les amines, les phénols que les thiols mais aussi les phosphothioates et les phosphodiesters (Berkowitz and Silk 1981 ; Le Pla, Bowman *et al.* 2006). Sa capacité de méthylation par substitution nucléophile SN_2 tient du fait que l'ion sulfate est un bon groupe partant. Il est employé dans le séquençage de l'ADN par la méthode de Maxam et Gibert (Maxam and Gilbert 1977) par méthylation de l'azote à la position N7 des guanines et dans une moindre mesure, à la position N3 des adénines. Sa toxicité a conduit à l'utilisation de molécules alternatives, tel que l'iodure de méthyle pour les O-méthylations ou le carbonate de diméthyle pour les N-méthylations.

Les imidates présentent également un intérêt majeur (Roger and Neilson 1961). Facilement synthétisables ou commercialisés, il existe un panel important de ces composés capables d'alkyler les groupements hydroxyles mais également capables de former des esters d'acides phosphorique, par un intermédiaire dérivé de l'urée (Khorana 1954 ; Abdel-Rahman, Winterfeld *et al.* 2002).

N-nitroso-N-éthylurée (ENU) et N-nitroso-N-méthylurée (MNU) appartiennent aux composés hautement mutagènes car ils sont capables de transférer leur groupement éthyle ou méthyle sur les bases des acides nucléiques (Russell, Kelly *et al.* 1979). Ainsi, leur utilisation en milieu aqueux est tout à fait possible, le dérivé éthyle ayant un pouvoir alkylant supérieur au dérivé méthyle (Berkowitz and Silk 1981 ; Le Pla, Bowman *et al.* 2006).

Les oxides de nitriles sont connus pour être instables, caractère amélioré si on ajoute à proximité de cette fonction un groupe stériquement encombrant. Les oxides de nitriles sont le plus souvent exploités comme intermédiaire dans les réactions de cyclisation mais peuvent également être employés pour leur pouvoir alkylant sur les phosphonates. Ces molécules ont un intérêt notable car au cours de la réaction d'alkylation avec les oxides de nitrile, il y a libération d'une fonction oxime (figure 32). Ils peuvent représenter la classe des réactivateurs bifonctionnels portant une fonction alkylante masquant la fonction oxime réactivatrice (Cadogan and Maynard 1966 ; Cadogan and Eastlick 1970).

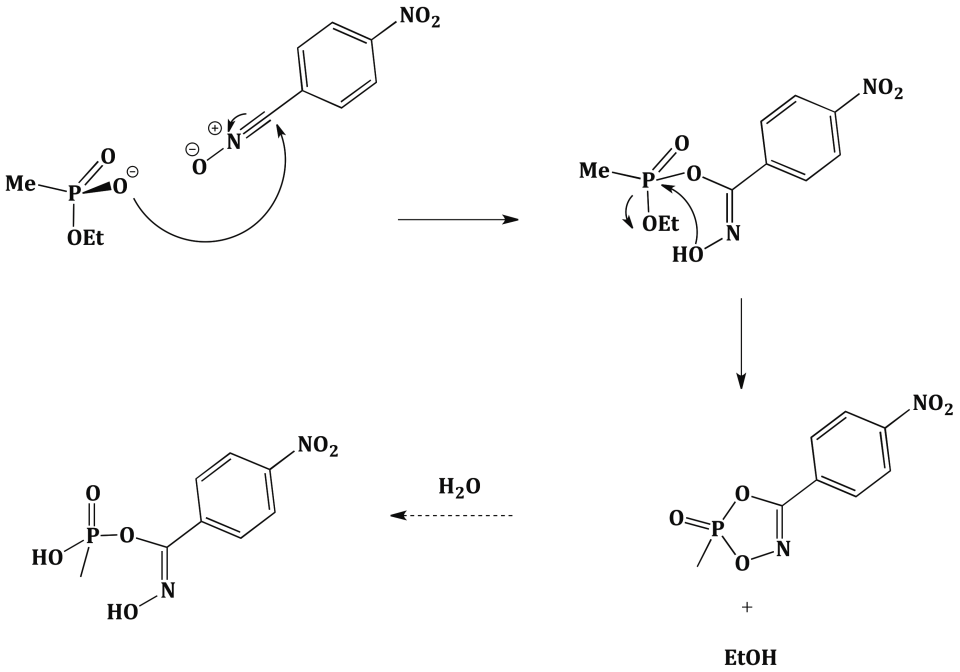


Figure 32 : Mécanisme d'alkylation du O-éthyl méthylphosphonate par le para-nitrobenzonitrile. Le groupement O-éthyle pourrait être remplacé par la sérine catalytique de l'AChE.

Enfin, Turnbull *et al.* ont développé l'alkylation de phosphates et de phosphoesters par des dérivés de méthylène quinones en milieu aqueux (Zhou and Turnbull 2001) (Bakke, McIntosh *et al.* 2005) (figure 33).

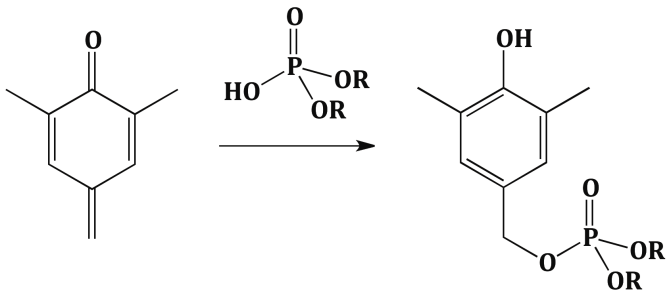


Figure 33: Réaction d'alkylation de phosphodiester par un dérivé méthylène quinone

Il existe, bien entendu, d'autres composés ayant révélé leur potentiel d'alkylation sur des groupes phosphonates.

2-1-2. Efficacité d'agents alkylants commerciaux …..

2-1-2-1 … sur un modèle simple

A partir des données de la littérature ci-dessus, nos collaborateurs au TNO ont testé l'efficacité de la réaction d'alkylation sur un acide O-éthyl méthylphosphonique par les composés disponibles dans le commerce (figure 34). En effet, cet acide phosphonique apparaît comme le modèle le plus simplifié pour représenter le résidu sérine phosphonylée dans le site actif de l'AChE vieillie. L'acide O-éthyl méthylphosphonique est mis en présence de 2 équivalents d'agent alkylant et d'un équivalent de DiPEA, le tout dilué en acétonitrile. La réaction est suivie par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et par analyse RMN de l'isotope de phosphore ^{31}P. En effet, les spectres de masse et de RMN du ^{31}P seront différents entre le produit de départ, l'acide O-éthyl méthylphosphonique et le produit d'arrivée O-éthyl-O-alkyl méthylphosphonate (données non communiquées).

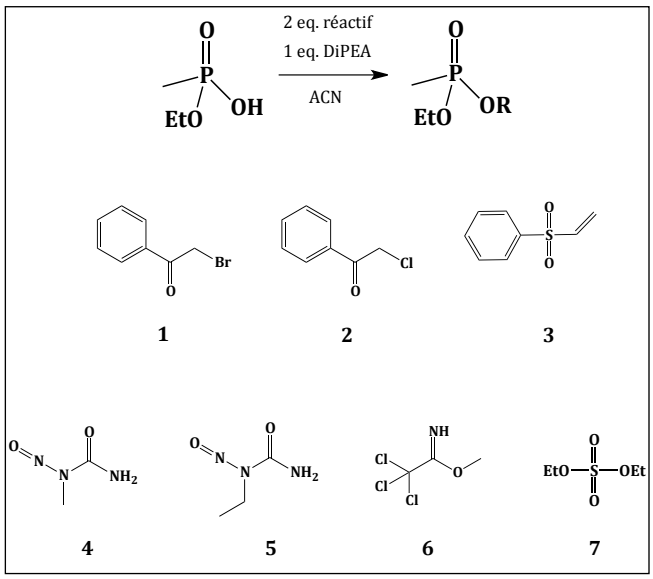


Figure 34 : Réaction d'alkylation de l'acide O-éthyl méthylphosphonique avec des réactifs commerciaux (1. 2-bromophényléthanone ; 2. 2-chlorophényléthanone ; 3. vinylsulfonylbenzène ; 4. MNU ; 5. ENU ; 6. méthyl 2,2,2-trichloroacétimidate; 7. sulfate de diéthyle – DiPEA : diisopropyléthylamine : ACN : acétonitrile).

La réaction est exprimée en taux de conversion du produit de départ en produit d'arrivée (tableau 35). Ainsi, les fonctions céto-halogénures et le sulfate de diéthyle permettent une alkylation totale de l'acide O-éthyl méthylphosphonique alors que les fonctions N-nitroso-N-alkylurée n'entraînent qu'une alkylation partielle. Les fonctions imidate et vinylsulfone ne semblent pas avoir d'intérêt dans l'alkylation d'acide phosphonique puisque le taux de conversion apparaît nul.

composé	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
% conversion	100	100	0	50	50	0	100

Tableau 35: Taux de conversion (%) de l'acide O-éthyl méthylphosphonique en O-éthyl-O-alkyl méthylphosphonique en fonction de l'agent alkylant employé.

2-1-2-2 … sur un modèle peptidique

L'acide O-éthyl méthylphosphique reste le modèle le plus simple pour représenter la sérine phosphonylée du site catalytique de l'AChE vieillie. Pour rendre ce modèle plus représentatif, nos collaborateurs néerlandais ont synthétisé un nonapeptide comprenant la sérine catalytique modifiée par un groupement méthylphosphonyle, ainsi que les trois résidus en amont et les cinq résidus en aval de la sérine (FGES*AGAAS, où S* correspond à la sérine modifiée).

La synthèse de ce peptide est réalisée sur résine selon la méthode décrite par Fidder *et al.* (Fidder, Hulst *et al.* 2002), les fonctions réactives du peptide étant protégées, au cours de cette réaction, par des groupements Boc en N-terminal et ter-butyle sur les fonctions acide et hydroxyle. Le résidu correspondant à la sérine catalytique est ensuite phosphonylé pour mimer la réaction de vieillissement de l'enzyme. Après libération de la résine et déprotection des résidus, le peptide est purifié par HPLC en phase inverse. La séquence est vérifiée par spectrométrie de masse.

Les agents alkylants testés sur le peptide modèle sont les mêmes que ceux testés sur l'acide phosphonique (figure 34). Après mise en présence du peptide et des agents alkylants en milieu aqueux, à pH physiologique, le mélange est analysé par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Une première série de résultats a montré l'extrémité N-terminal comme étant le site principal d'alkylation. La seconde série de tests a été effectuée sur le même peptide, portant un groupement N-acétyle protecteur en N-terminal. Les résultats obtenus varient en fonction des agents alkylants.

Alors que les composés **2** et **3** n'ont montré aucun pouvoir alkylant sur le peptide, les autres composés ont engendré différents produits d'alkylation. Le composé **6** a conduit uniquement à une alkylation du résidu glutamate (E) et de l'extrémité C-terminale. Les composés **1**, **4**, **5** et **7,** quant à eux, ont permis l'alkylation de la sérine phosphonylée, mais principalement de l'extrémité C-terminale pour les composés **1** et **5** et de manière équivalente pour les trois sites pour les composés **4** et **7**. Aucun des réactifs commerciaux n'a donc montré une spécificité d'alkylation pour le modèle de sérine phosphonylée, même si certaines fonctions semblent plus adéquates à ce rôle que d'autres. Néanmoins, la réaction d'alkylation *in situ* est influencée pour l'environnement du site catalytique. Ainsi, aucune fonction ne doit être complètement mise à l'écart sans une analyse de leur potentiel alkylant au sein même de l'enzyme.

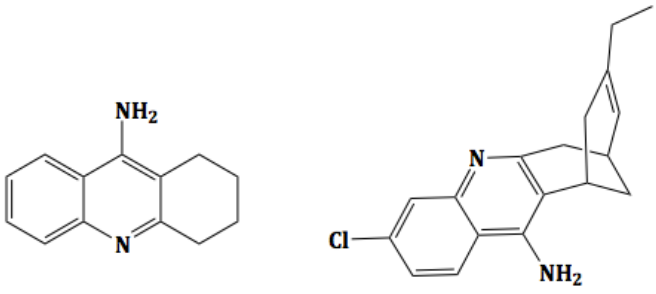
2-2. Choix du squelette

Le squelette sur lequel est greffé le ou les groupements fonctionnels nécessaires à la réactivation confère à la molécule son affinité vis à vis du site actif de l'enzyme. En effet, il est important que ces réactivateurs atteignent leur cible avec une

grande spécificité afin que l'alkylation n'ait pas lieu à des positions pour lesquelles l'intégrité de l'enzyme serait affectée. Mais ils ne doivent pas être trop affins pour éviter la présence permanente de cette molécule dans le site actif et donc une inhibition compétitive de l'activité enzymatique.

Le noyau pyridinium est choisi comme le noyau de base pour ces composés. On le retrouve chez toutes les oximes connues (cf. chapitre 1, paragraphe « Le développement des oximes », page 45). Il permet notamment d'abaisser le pKa des oximes vers un pH physiologique (Terrier, Rodriguez-Dafonte *et al.* 2006). Ce noyau aromatique s'associe par interaction cation-π (Hunter, Low *et al.* 2002) avec les résidus aromatiques du site actif, ce qui confère aux oximes une bonne affinité. Il a été montré que la présence de deux noyaux pyridinium, comme c'est le cas pour le HI-6 par exemple, améliore l'affinité de la molécule pour l'enzyme par liaison au site périphérique. C'est pourquoi, nous avons choisi de tester des composés basés sur un noyau méthylpyridinium ainsi que sur leur équivalent benzylpyridinium.

Notre choix de structure de base s'est aussi inspiré des nombreux inhibiteurs réversibles de l'acétylcolinestérase humaine, basés sur le noyau 4-aminoquinoline, et développés pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. La tacrine en est le chef de file (figure 36). Les dérivés de tacrine et d'huperzine A, nommés huprines, sont en particulier de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, avec des affinités de l'ordre du picomolaire. C'est le cas de l'Huprine X (constante d'inhibition K_i = 26 pM) (Camps, Cusack *et al.* 2000).



tacrine (-)-huprine X

Figure 36 : Structure chimique de la tacrine et de l'huprine X

La résolution de la structure de *Tc*AChE complexée à l'huprine X (Dvir, Wong *et al.* 2002) (figures 36 et 37) met en évidence les interactions de cette molécule avec les résidus du site actif de la *Tc*AChE.

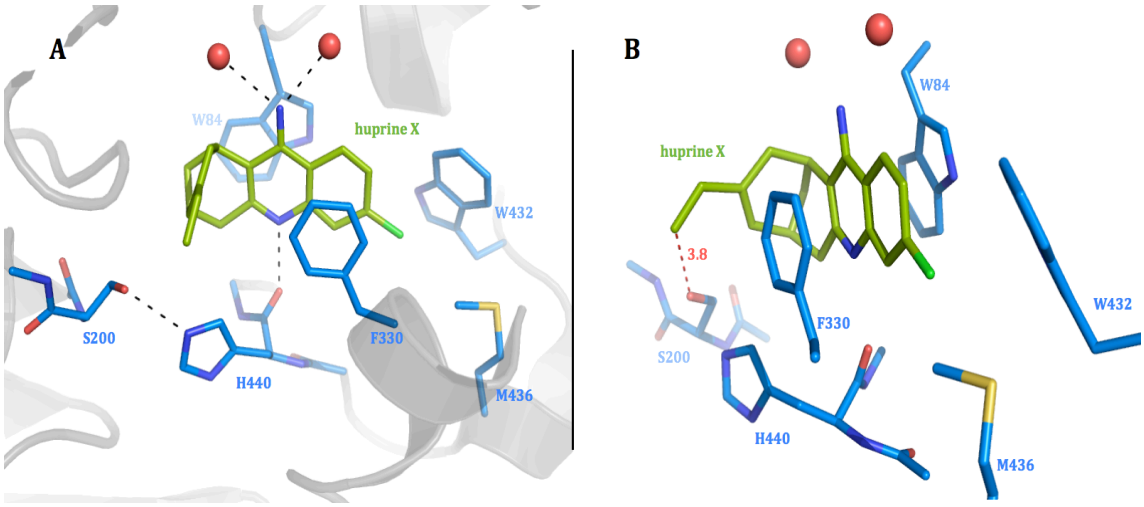


Figure 37 : Structure cristallographique du site actif de la TcAChE complexée à l'huprine X à 2.1 Å en vue de face (A) et vue latérale (B) (code pdb 1E66). Les résidus du site actif de la TcAChE sont représentés en bleu et l'huprine X est en vert. Les sphères rouges représentent les molécules d'eau structurales. Les pointillés noirs modélisent les liaisons hydrogène et les pointillés rouges les distances entre atomes.

La haute affinité de l'huprine X pour la *Tc*AChE s'explique par les interactions nombreuses et variées qui stabilisent l'inhibiteur dans le site actif. L'azote protoné du noyau pyridinium forme une liaison hydrogène avec le carbonyle de la chaîne principale de l'histine catalytique, tout comme le groupement amine avec deux molécules d'eau structurales, c'est-à-dire faisant partie intégrante de la structure du site actif et systématiquement présentes. L'atome de chlore est stabilisé par des interactions de type Van der Waals dans une poche hydrophobe formée par la Met436 et le Trp432,. Enfin, le noyau quinoline de l'huprine X, par stacking aromatique, forment des interactions cation-π et π-π avec le Trp84 et la Phe330 (correspondant à la Tyr337 chez l'hAChE).

Ces données ont été confirmées lorsque notre équipe a résolu la structure cristallographique de l'hAChE complexée à l'Huprine Z, dérivé de l'Huprine X dont le groupement éthyle en position 9 a été substitué par un goupement éthoxyle, ce qui permet à cette molécule d'interagir grâce à des liaisons hydrogène supplémentaires avec la sérine et l'histidine catalytiques (figure 38).

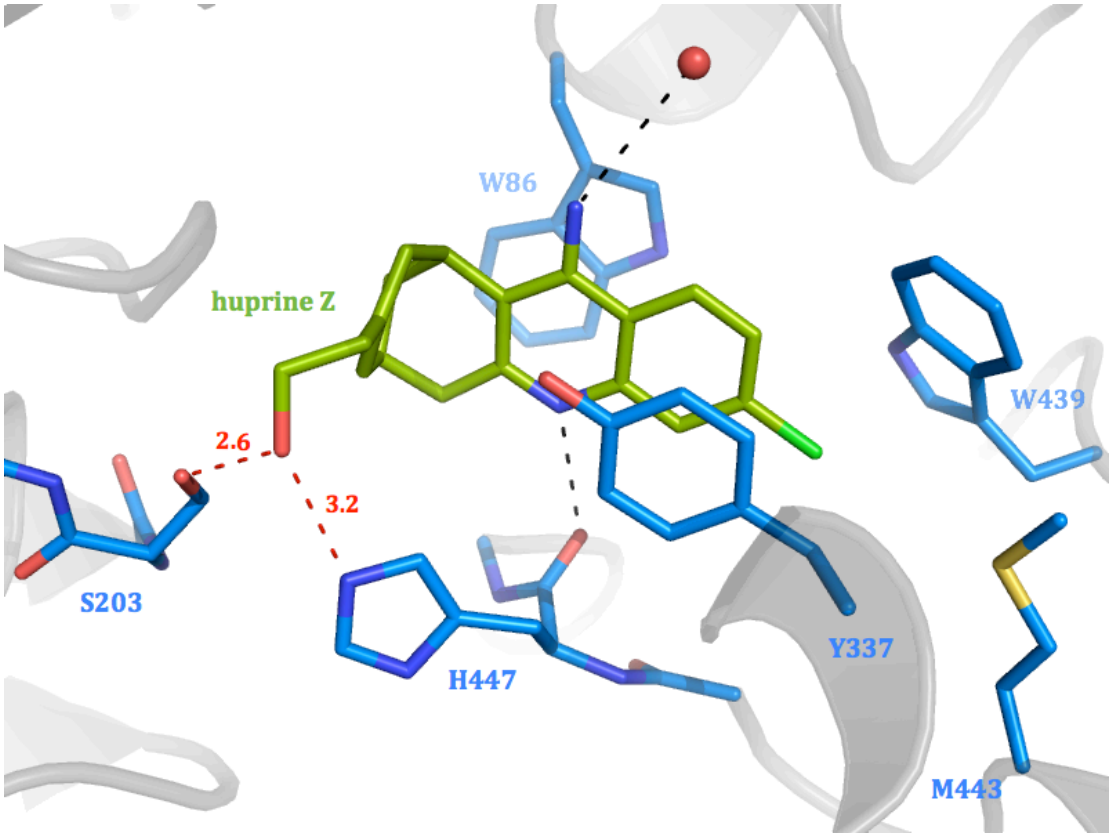
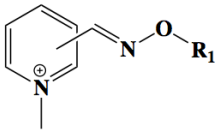


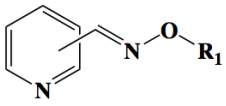
Figure 38 : Structure cristallographique du site actif de l'hAChE complexée à l'huprine Z à 3.2 Å (Carletti, non publiée). Les résidus du site actif de l'hAChE sont représentés en bleu et l'huprine Z est en vert. Les sphères rouges représentent les molécules d'eau structurales. Les pointillés noirs modélisent les liaisons hydrogène et les pointillés rouges les distances entre atomes.

Des réactivateurs et composés alkylants ont été modélisés à partir du noyau chloroquinoline, sur la base de ces données structurales.

2-3. Construction de la bibliothèque de ligands

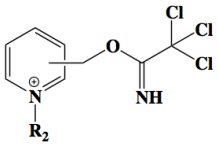
Tous les ligands analysés, réactivateurs bifonctionnels et agents alkylants potentiels, sont regroupés dans les tableaux 39 et 40 et la figure 41.

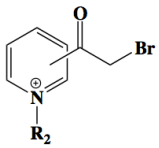




groupement R_1	Position de la fonction réactive sur un le noyau ***pyridinium***		Position de la fonction réactive sur le noyau ***pyridine***	
	ortho	*para*	*ortho*	*para*
methyl	101	102	201	202
ethyl	103	104	203	204
iso-butyl	105	106	205	206
benzyl	107	108	207	208
4-methoxybenzyl	109	110	209	210
2,4-dimethoxybenzyl	111	112	211	212
2,3,4,5,6-fluorobenzyl	113	114	213	214
4-nitrobenzyl	115	116	215	216

Tableau 39 : Structure chimique des réactivateurs bifonctionnels, basés sur le noyau pyridinium, et leur numéro correspondant.





groupement R_2	Position de la fonction réactive sur le noyau pyridinium/pyridine				
	ortho	*para*	*ortho*	*meta*	*para*
H			219	220	221
methyl	117	118	119	120	121
benzyl	317	318	319	320	321

Tableau 40 : Structure chimique des agents alkylants, basés sur le noyau pyridinium, et leur numéro correspondant.

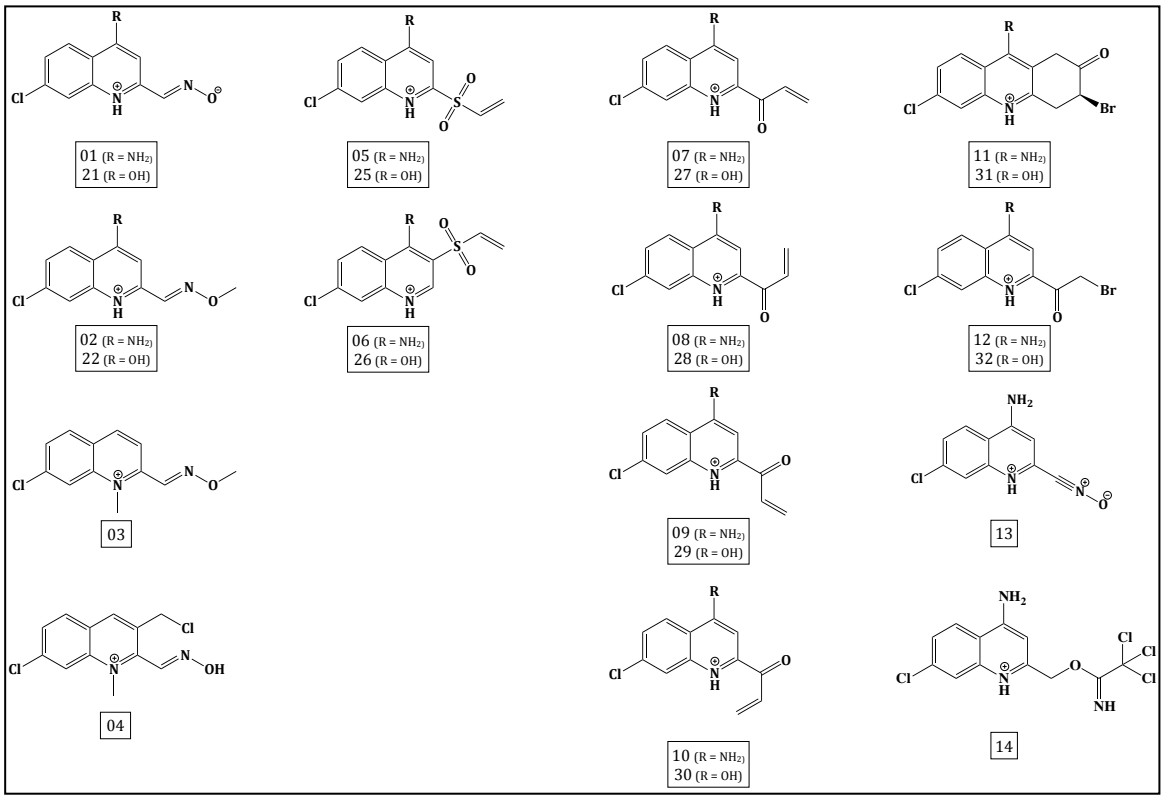


Figure 41 : Structure chimique des agents alkylants et des réactivateurs bifonctionnels basés sur le noyau chloroquinoline, et leur numéro correspondant.

Le modèle moléculaire de chaque ligand est construit à partir du serveur GlycoBioChem PRODRG2 (Schuttelkopf and van Aalten 2004). Ensuite, le logiciel Chimera (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) est utilisé pour ajouter les hydrogènes à la molécule en tenant compte d'une éventuelle protonation à pH physiologique. Le module Antechamber d'Amber, intégré à Chimera sert à attribuer les types d'atomes et de liaisons ainsi qu'à calculer les charges partielles de chaque atome selon la méthode semi-empirique AM1-BCC. La correction de la charge des liaisons est paramétrée pour reproduire *ab initio* les potentiels électrostatiques (Wang, Wang *et al.* 2006). La géométrie du ligand est alors minimisée à partir des charges calculées ainsi que des autres paramètres du champ de force GAFF (General AMBER Force Field) (Wang, Wolf *et al.* 2004).

3. Préparation du récepteur = l'hAChE

L'AChE humaine est la cible de notre étude et des données cristallographiques existent pour cette enzyme. C'est donc sur l'AChE humaine que s'est naturellement porté notre choix du "récepteur" pour les expériences de docking moléculaire. Les

nombreux résidus aromatiques du site actif de l'hAChE peuvent adopter différentes conformations suivant les ligands et cette flexibilité doit être considérée lors des simulations *in silico* sous peine d'obtenir une prédiction trop éloignée de la situation réelle.

Deux solutions s'offraient à nous : soit nous utilisions la fonction du logiciel de docking donnant une liberté conformationnelle à la chaîne latérale des résidus capables alors d'adopter plusieurs conformations, soit nous utilisions plusieurs conformations rigides de l'enzyme, représentatives des conformations adoptées en présence du ligand, ou du moins de la famille structurale des ligands testés. Notre expérience personnelle nous a montré que la deuxième solution donnait généralement des résultats plus satisfaisants. Nous avons donc choisi de préparer deux conformations de l'AChE humaine nommées **récepteur 1** et **récepteur 2**.

La première conformation (**récepteur 1**) représente l'hAChE sous forme de conjugué vieilli (sérine catalytique méthylphosphonylée), avec les résidus de la gorge dans la conformation originale observée dans la structure cristallographique de l'hAChE complexée à la fasciculine II (code pdb 1B41) (Kryger, Harel *et al.* 2000). Pour se faire, la sérine méthylphosphonylée est construite *in silico*, dans la structure de l'hAChE, en prenant comme modèle la *Tc*AChE inhibée par le soman (code pdb 1SOM) (Millard, Kryger *et al.* 1999). Le modèle « hAChE vieillie » est ensuite plongé dans une boîte d'eau puis minimisé à l'aide du logiciel de dynamique moléculaire GROMACS 4.5.4 (Hess, Kutzner *et al.* 2008) afin d'optimiser la topologie de la protéine (angles, distances, interactions de Van der Waals et électrostatiques). Le réseau de molécules d'eau est finalement relaxé par un dynamique moléculaire de 20 ps en imposant une contrainte sur la position des atomes de la protéine.

La seconde conformation (**récepteur 2**) représente également l'hAChE vieillie mais dont les résidus du site actif sont positionnés tels qu'ils le sont dans la structure résolue au laboratoire de l'hAChE complexée à l'huprine Z. En effet, comme décrit précédemment, la liaison d'une molécule telle que l'huprine Z ou l'huprine X dans le site actif de l'enzyme (code pdb 1E66), stabilise des conformations particulières de certains résidus du site actif, principalement dans la poche « choline » pour les dérivés de la famille de la 4-aminoquinoline. Nos

réactivateurs potentiels basés sur la chloroquinoline possèdent une structure chimique voisine des huprines.

Pour la préparation de ce modèle, il n'est pas possible de construire la méthylphosphonylsérine dans la structure cristallographique de l'hAChE complexée à l'huprine Z en raison de l'occupation du site estérasique par le bras portant l'alcool primaire de l'huprine Z. L'huprine Z est donc d'abord remplacée par la chlorotacrine (figure 42), plus petite, qui sera la molécule de référence pour l'analyse par docking. Ensuite, la sérine catalytique est méthylphosphonylée pour obtenir un conjugué d'hAChE vieillie comme pour le récepteur 1. Enfin, le récepteur « hAChE vieillie complexée à la chlorotacrine » est minimisé et le réseau de molécules d'eau relaxé avec GROMACS comme pour le récepteur 1.

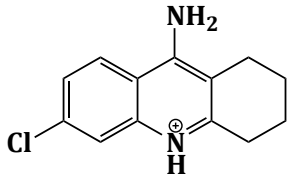


Figure 42 : Structure chimique de la chlorotacrine, molécule de référence.

Une comparaison de la topologie du site actif de ces deux récepteurs, révèle d'importantes différences, logiquement au niveau de la poche « choline « (figure 43).

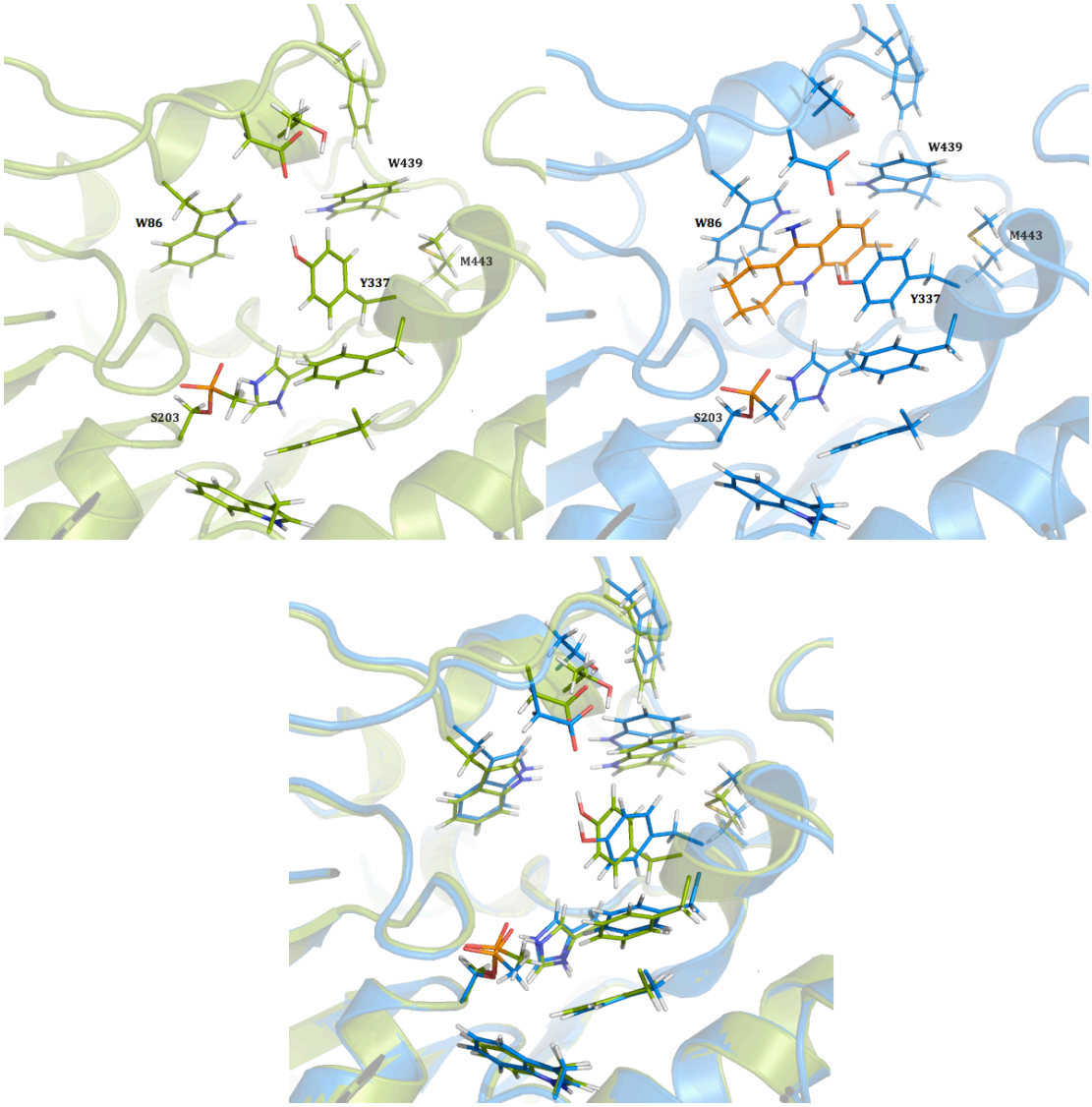


Figure 43 : Site actif du récepteur 1 (en vert) et du récepteur 2 avec chlorotacrine (en bleu) ainsi que leur superposition. (les atomes de carbone sont en vert ou en bleu, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu foncé, les atomes d'hydrogène en blanc et les atomes de phosphore en orange).

La superposition des sites actifs permet de visualiser les modifications de positionnement de certains résidus, dues à la présence de la chlorotacrine dans le site actif. Les résidus Tyr337 et Trp439 s'écartent pour accueillir la chlorotacrine et la stabiliser par empilement aromatique entre Tyr337 et Trp86. Met443 et Trp439 reculent pour former une poche hydrophobe capable d'accueillir le substituant chlore. De plus, nous observons des mouvements non négligeables de la chaine principale qu'il n'aurait pas été possible de prendre en compte en ne donnant de la liberté de rotation qu'aux chaines latérale des résidus aromatiques. Ces observations confortent notre choix d'opter pour deux récepteurs rigides

rendant mieux compte de la flexibilité du site actif pour l'analyse des candidats ligands par docking moléculaire.
Le docking moléculaire a été effectué sur les deux récepteurs, en conservant ou non un réseau de molécules d'eau qui participe au maintien de la structure de la poche « choline » par un réseau de liaisons hydrogène s'étendant de Tyr133 à Tyr341. Ce réseau contient les deux molécules d'eau qui forment des liaisons hydrogène avec l'amine de l'huprine X (figure 37). En absence de ce réseau, le site de liaison est plus spacieux mais le nombre de liaisons hydrogène potentielles entre le ligand et l'enzyme diminue. Ceci permet d'évaluer l'influence de ce réseau sur le positionnement et l'orientation du ligand.

Chacun des ligands préparés est analysé dans les récepteurs 1 et 2 avec ou sans réseau d'eau complet, ce qui correspond à 4 dockings par ligand. La molécule de référence, la chlorotacrine, qui a servi à construire le récepteur 2, est également testée dans chacune des conformations et constitue un contrôle.

4. *Résultats*

Les valeurs de variation d'énergie libre obtenues pour chacun des ligands, alkylants et réactivateurs bifonctionnels, sont regroupées dans les tableaux 46, 49, 53 et 57. Celles-ci sont représentatives de l'affinité potentielle du ligand pour le récepteur et peuvent être comparées entre elles. Néanmoins, l'affinité d'un ligand pour le récepteur ne traduit pas son efficacité car un positionnement de la fonction électrophile à proximité de la cible, l'oxyanion du méthylphosphonyle, est un facteur déterminant. Les ligands intéressants doivent allier une variation d'énergie libre négative et de valeur absolue importante et un positionnement optimium pour que les deux fonctions destinées à réagir soient juxtaposées dans le site actif.

4-1. Validation des conditions d'analyses

Parmi les quatre récepteurs utilisés pour le docking moléculaire, un seul semble adapté à une comparaison juste des ligands lorsqu'ils sont complexés à l'enzyme : **le récepteur 2 dont le réseau de molécules d'eau a été conservé**.

4-1-1 Le choix du récepteur

Les valeurs de ΔG des ligands pour le récepteur 1 avec conservation du réseau de molécules d'eau sont pour la majorité positive. Ceci indique que la fixation des ligands dans ce récepteur, dans le volume restreint du fond de la gorge, « coûte de l'énergie » au système enzyme+ligand. En effet, la présence des molécules d'eau du réseau limite l'espace disponible dans la poche « choline » et conduit à des contraintes stériques coûteuses en énergie pour les ligands si leur structure n'est pas parfaitement adaptée à la topographie du site. Les résidus de cette poche ne peuvent favorablement accueillir de gros ligands à double noyau aromatique car l'orientation des résidus Trp86 et Tyr337, habituellement impliqués dans les interactions d'empilement aromatique, n'est pas optimum.

Les petits ligands, ceux ne possédant qu'un seul cycle aromatique méthylpyridinium ou pyridine, sont favorablement accomodés, avec des valeurs de ΔG pouvant atteindre -5.0 kcal.mol^{-1}, ce qui reste faible. Ces ligands semblent peu stabilisés, ce qui est confirmé par le faible nombre d'interactions avec les résidus de la gorge.

En revanche, dans le récepteur 2, les résidus Trp86 et Tyr337 de cette poche étant orientés de manière optimale pour stabiliser les ligands par empilement aromatique, les valeurs de ΔG sont toutes situées entre -8.0 et -10.4 kcal.mol^{-1}.

4-1-2 Influence de la conservation du réseau complet de molécules d'eau

Lorsque que l'on compare, pour le récepteur 1, les valeurs de ΔG obtenues en présence et en absence du réseau complet de molécules d'eau, il est flagrant que le gain de degrés de liberté pour la position et l'orientation des gros ligands améliore considérablement les énergies de liaison (entre -6.0 et -8.0 kcal.mol^{-1}). Mais ces résultats s'accompagnent d'une orientation aléatoire des ligands, généralement défavorable à la réaction d'alkylation recherchée.

Pour le récepteur 2, les valeurs de ΔG en présence ou en absence de molécules d'eau dans la gorge sont peu différentes. La stabilisation du ligand dans le site par interaction aromatique semble donc le facteur le plus important.

Ces résultats confortent l'hypothèse que le récepteur 2 est plus représentatif de la strucure du site actif en présence de nos ligands, notamment la famille de ceux

possédant deux cycles aromatiques (dérivés de la chloroquinoline et du benzylpyridinium). La présence du réseau de molécules d'eau apparaît souhaitable sachant que la majorité de ces molécules sont importantes dans le maintien de l'architecture du site actif, ce qui est confirmé par leur présence dans la totalité des structures cristallographiques de cholinestérases avec ligands (figure 44). De plus, les simulations de dynamique moléculaire effectuées lors de la préparation des récepteurs confirment la stabilité de ce réseau lorsque l'enzyme est en solution aqueuse.

Ainsi, nous nous sommes focalisés sur les résultats de docking moléculaire obtenues à l'aide du **récepteur 2 avec réseau d'eau complet** afin de prédire au mieux les interactions des ligands que nous avons conçus avec l'hAChE vieillie.

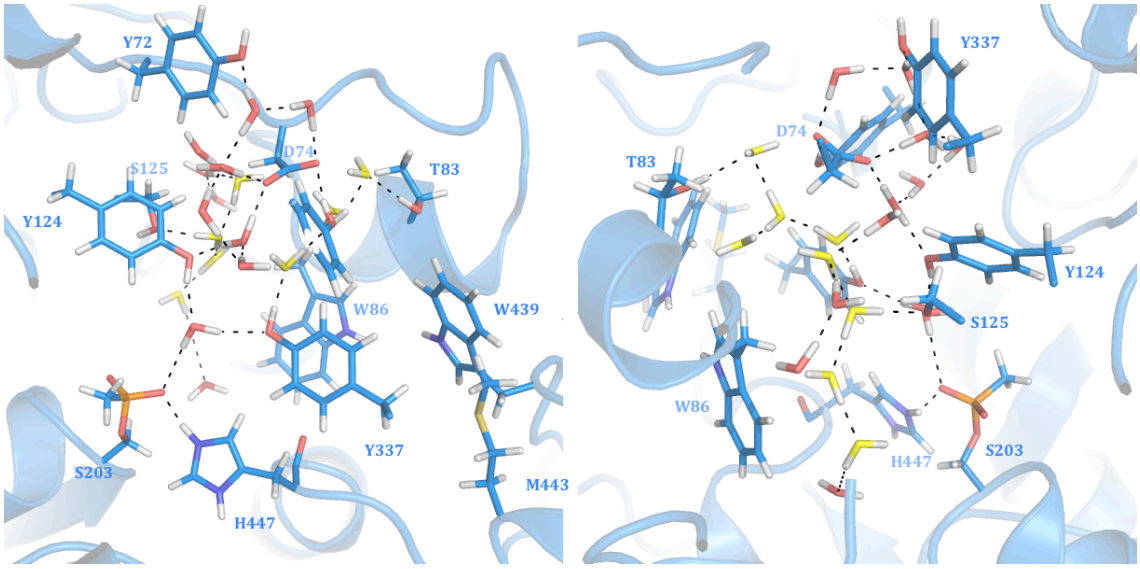


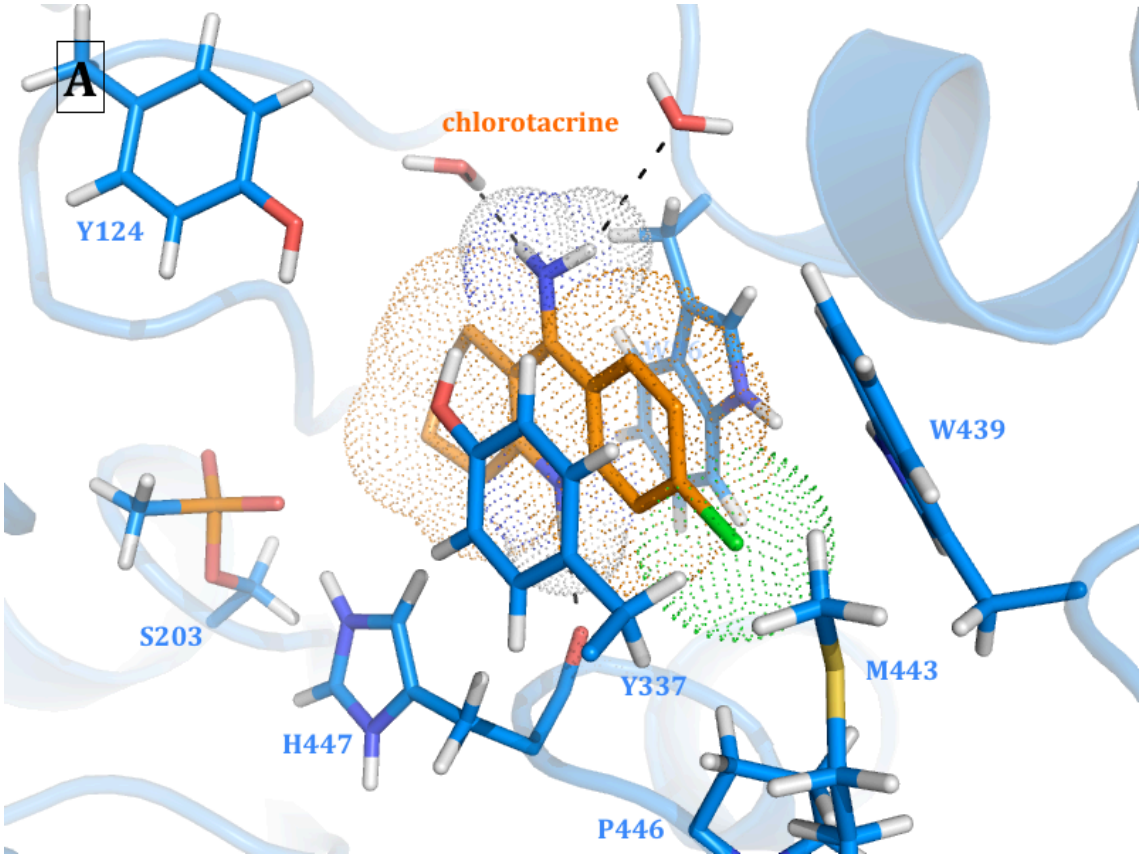
Figure 44 : Complexité du réseau d'eau présent dans le site actif de l'hAChE.
Les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge et jaune, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés noirs. Les molécules d'eau représentées en jaune sont présentent dans le récepteur, uniquement pour l'expérimentation en présence du réseau d'eau complet.

4-2. Les ligands basés sur un noyau chloroquinoline

4-2-1 Validation du modèle

Comme décrit précédemment, la chlorotacrine a été choisie comme molécule de référence dans l'évaluation du modèle vis à vis des ligands basés sur le noyau chloroquinoline. Nous rappelons que la chlorotacrine est le ligand choisi pour que soit conservée, lors de la minimisation d'énergie du récepteur 2, une conformation des résidus du site actif, proche de celle dans la structure de l'hAChE complexée à l'huprine Z.

L'énergie d'interaction de cette molécule de référence avec le récepteur 2 est de - 11,2 kcal.mol^{-1}. Son affinité est évaluée de l'ordre du nanomolaire ce qui correspond à l'ordre de grandeur des valeurs que l'on retrouve dans la littérature pour des molécules dont la structure chimiques est proche (tacrine, huprines X, Y, ...)(Camps, Cusack *et al.* 2000 ; Ronco, Sorin *et al.* 2009 ; Ronco, Foucault *et al.* 2011). Le mode de fixation de la chlorotacrine dans le récepteur est conforme à celui observé lors de la dynamique moléculaire à l'étape de préparation du récepteur 2 (figure 45). On retrouve les interactions-clé de cette famille de ligands : double stacking entre le noyau aminoquinoline et Trp86/Tyr337, liaisons hydrogènes entre le proton quinolinium et le carbonyle de His447, entre l'amine et des molécules d'eau du réseau, et enfin confinement du chlore dans la poche hydrophobe formée par les résidus Met443, Trp439 et Pro446.



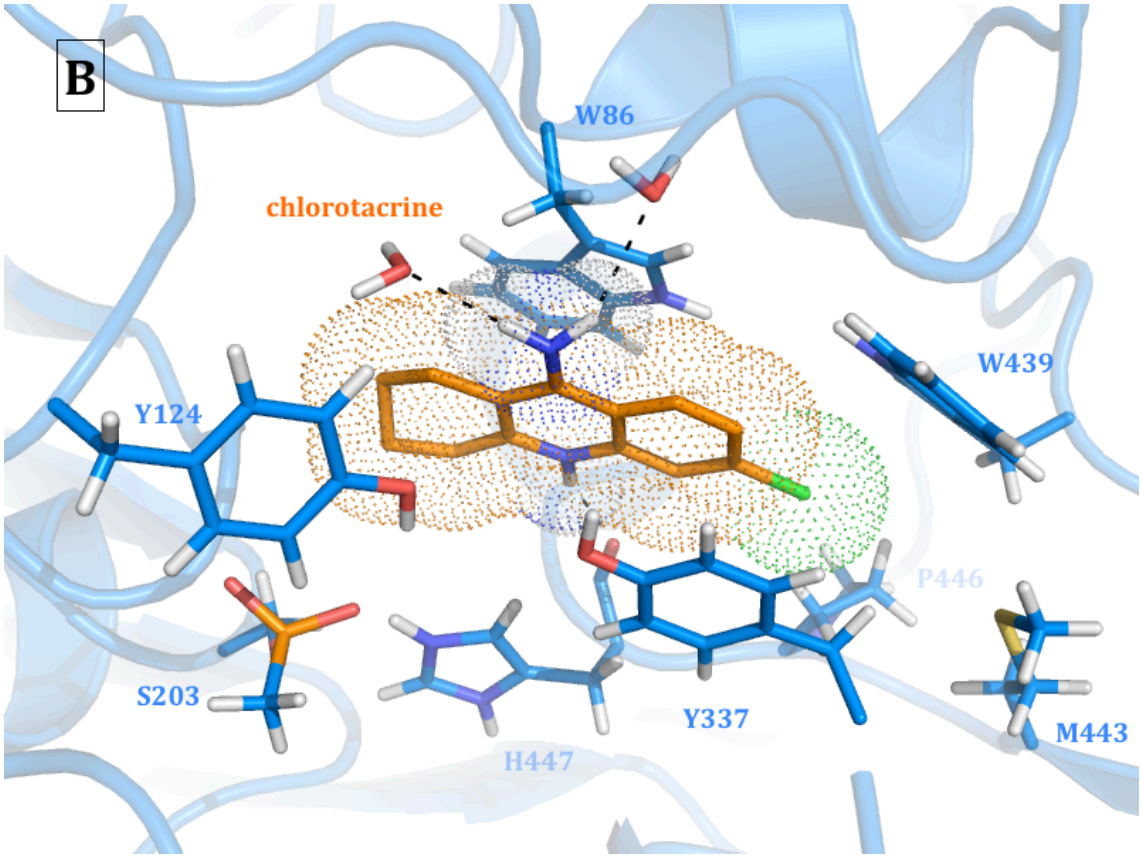


Figure 45 : Représentation de la fixation de la chlorotacrine dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire, en vue latérale (A) et vue de dessus (B). Les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, de phosphore en orange. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés noirs. Le volume occupé par la chlorotacrine est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes.

Les résultats obtenus pour la chlorotacrine, référence dans cette expérience de docking moléculaire, valide le choix du récepteur 2 pour la prédiction de l'interaction de nos réactivateurs et agents alkylants potentiels avec l'hAChE vieillie.

4-2-2 Les réactivateurs bifonctionnels à noyau chloroquinoline

Ce groupe de ligands est composé de 3 réactivateurs bifonctionnels dont la fonction oxime est masquée par la fonction alkylante (ligands n° 02, 22, 03), 1 réactivateur bifonctionnel dont les fonctions oxime et alkylante sont séparées sur le squelette (ligand n° 04) et 2 molécules ne portant qu'une fonction oxime (ligands n° 01, 21) (tableau 41).

N° ligand	ΔG (kcal.mol^{-1})	N° ligand	ΔG (kcal.mol^{-1})
01	-9.8	**21**	-9.6
02	-7.9	**22**	-7.7
03	-7.4		
04	-6.1		

Tableau 46 : Variation d'énergie libre de liaison des réactivateurs bifonctionnels basés sur le noyau chloroquinoline (tableau 41, page 80), analysés par docking moléculaire dans le récepteur 2, en présence du réseau d'eau complet.

Les ligands ayant une correspondance amine ou hydroxyle en position 4 du squelette chloroquinoline (n° 01 *vs* n° 21 et n° 02 *vs* n°22) ne présentent pas de différence notable d'énergie de liaison (ΔΔG = 0.2 kcal.mol^{-1}) (tableau 46) ou de position dans le site actif. Cette observation suggère que l'amine est interchangeable avec un hydroxyle, mais ceci doit être considéré avec précaution car les deux fonctions n'ont pas la même influence sur le pKa du quinolinium.

Le simple ajout d'un groupement méthyle pour masquer la fonction oxime diminue l'énergie de liaison de 2 kcal.mol^{-1} (ligand n°01 *vs* ligand n°02), ce qui signifie que le ligand portant l'oxime masquée est 100 fois moins affin que l'oxime libre correspondante, malgré une orientation adéquate pour une alkylation de l'oxygène du méthylphosphonate (figure 47-A). La différence d'énergie provient logiquement d'un encombrement stérique défavorable au méthyle.

Le docking prédit que l'affinité du ligand n°01 est de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, avec une fixation optimale dans le site actif (3.7 Å entre le phosphore du méthylphosphonate et l'oxygène de l'oxime) (figure 47-B), cette nouvelle oxime possède un intérêt certain pour la réactivation des cholinestérases inhibées et dont l'adduit phosphonate présente un faible encombrement stérique (substituant méthoxyle ou éthoxyle sur le phosphore). Ce cas de figure se présenterait par génération de l'oxime n°01, *in situ,* après transfert du méthyle du ligand n°02 vers le phosphonate.

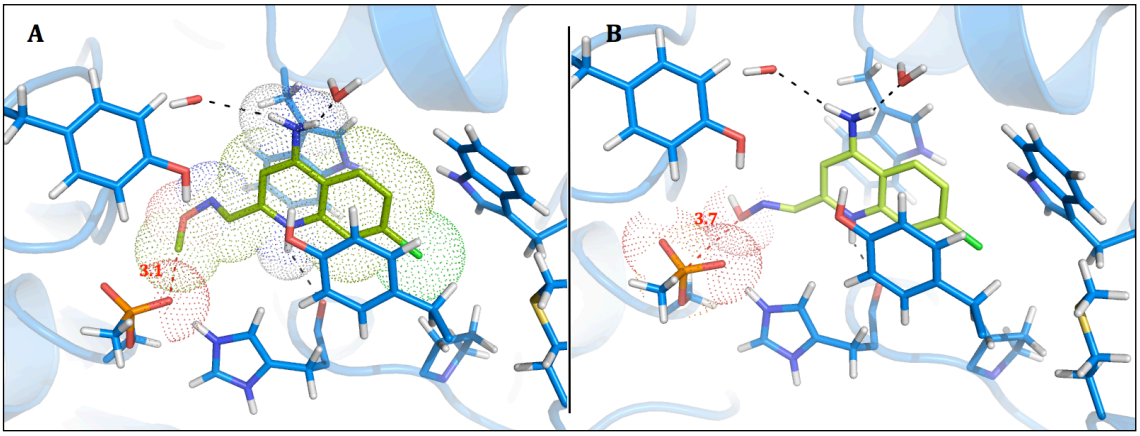


Figure 47 : Ligands n°02 (A) et n°01 (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés noirs. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés rouges.

L'énergie de liaison des ligands n°02 et n°03 portant la même fonction oxime méthylée, varie très peu selon que le squelette porte un groupe amine en position 4 (ligand n°02) ou un méthyle sur l'azote du pyridinium (ligand n°03). Le ligand n°04 est le seul représentant des réactivateurs bifonctionnels dont les fonctions alkylante et oxime sont séparées sur le squelette chloroquinoline. La valeur de ΔG correspond à une affinité de l'ordre de la dizaine de micromolaire. Cela s'explique aisément par la position tête-bêche du ligand en comparaison à la position de la chlorotacrine dans la poche choline (figure 48). L'atome de chlore en position 7 n'est plus stabilisé car il est en dehors de la poche hydrophobe, l'absence de groupement amine en position 4 abolit la possibilité de former des liaisons hydrogène avec le site actif. Seul subsiste le stacking aromatique avec Trp86 et Tyr337. Cependant, la distance entre les atomes réactifs est de 4.3 Å, ce qui reste raisonable pour envisager une réaction chimique en tenant compte de l'agitation thermique.

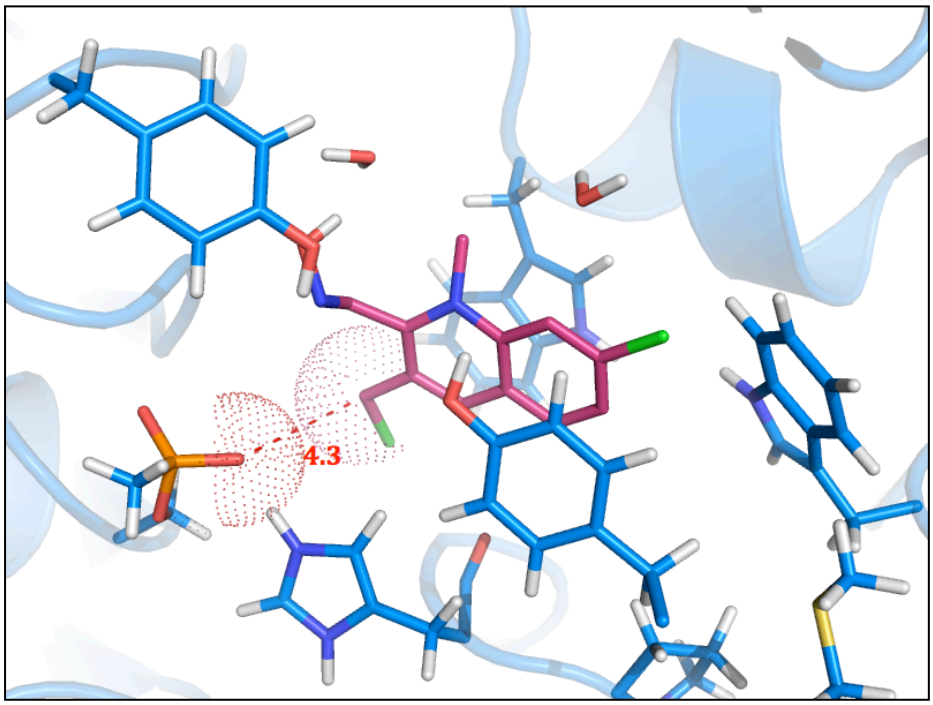


Figure 48 : Ligand n° 04 dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atome. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés rouges.

4-2-3 Les agents alkylants à noyau chloroquinoline

N° ligand	ΔG (kcal.mol^{-1})	N° ligand	ΔG (kcal.mol^{-1})
05	-9.6	**25**	-9.5
06	-9.3	**26**	-9.0
07	-9.4	**27**	-9.4
08	-9.3	**28**	-9.2
09	-9.7	**29**	-9.4
10	-9.4	**30**	-9.2
11	-8.9	**31**	-8.9
12	-9.2	**32**	-9.0
13	-9.0		
14	-5.9		

Tableau 49 : Variation d'énergie libre de liaison des agents alkylants basés sur le noyau chloroquinoline (tableau 41, page 80), analysés par docking moléculaire dans le récepteur 2, en présence du réseau d'eau complet.

Tout comme pour la précédente famille, la présence d'un groupement amine ou hydroxyle en position 4 du noyau chloroquinoline ne modifie ni l'énergie de liaison, ni la position dans le site actif. Les remarques indépendantes de la nature de ce groupement, notamment celles concernant la position des fonction réactives, sont donc identiques pour les ligands ne différant que par la nature de ce groupement en position 4 (amine ou hydroxyle).

Mise à part le ligand n°14, le docking moléculaire prédit que tous les agents alkylants basés sur le noyau chloroquinoline ont une très bonne affinité pour le récepteur 2 et une orientation adéquate .

En comparant les résultats de modélisation pour les ligands portant la même fonction alkylante, il est observé que :

- Les ligands n°05 et n°06 portant respectivement la fonction vinylsulfonyle en position meta ou ortho du quinolinium, ont des énergies d'interaction très favorables (~ -9.5 kcal.mol^{-1}). Néanmoins, leur position ne semble pas adaptée pour la réaction d'addition 1,4 nécessaire entre l'oxygène du méthylphophonate et le carbone terminal, en beta du soufre. Pour les deux ligands, le carbone-siège de l'addition pointe dans une direction opposée à l'oxygène du méthylphosphonate, à une distance de 5.0 Å pour le ligand n°05 et 4.0 Å pour le ligand n°06 (figure 50).

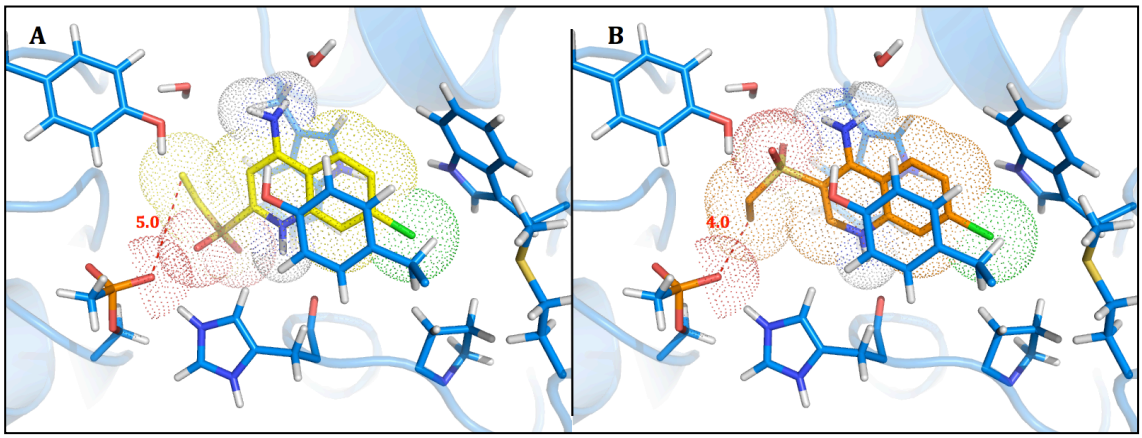


Figure 50 : Ligands n° 05 (A) et n° 06 (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés rouges.

- Les ligands portant la fonction vinylcétone dans 4 conformations différentes adoptent tous le même mode de liaison dans le site actif avec le carbonyle en anti-

du squelette chloroquinoline et l'alcène en anti- du carbonyle. Comme pour les ligands portant la fonction vinylsulfonyle, et malgré une énergie de liaison favorable, la position du ligand dans le site actif semble incompatible avec une réaction d'addition, les deux atomes n'étant pas alignés et trop éloignés (5.1 Å).

- Les ligands portant une fonction bromoacétyle, cyclique ou aliphatique, ont une énergie de liaison et une position dans le site actif largement favorables à la réaction d'alkylation. Les atomes réactifs sont proches (3.7 Å) et l'atome de brome jouant le rôle de groupe partant dans la réaction d'alkylation pointe en direction opposée de l'oxygène, vers l'entrée de la gorge (figure 51).

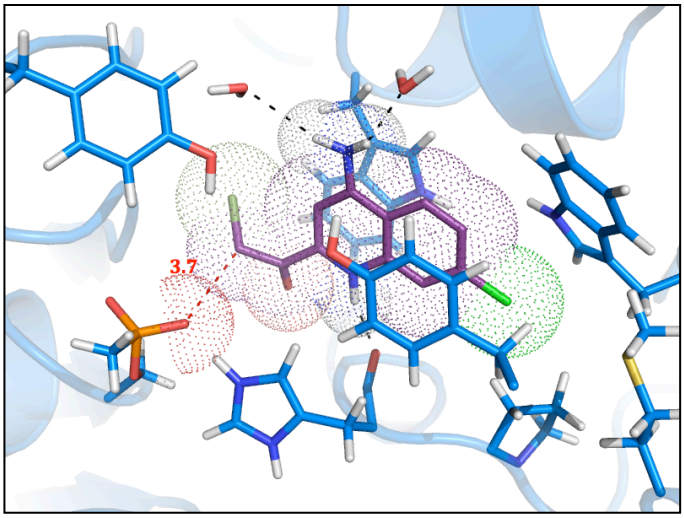


Figure 51 : Ligand n° 12 dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés noirs. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atome. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés rouges.

- Les mêmes conclusions s'appliquent au ligand n° 13, sa liaison à l'hAChE étant énergétiquement favorable et sa position adéquate pour l'alkylation recherchée (distance carbone-oxygène = 3.9 Å).

- Le ligand n° 14 est le seul de cette famille qui semble inadapté à notre objectif. En effet, le groupement trichloroacétimidate étant trés encombrant, il entre en conflit stérique avec le réseau de molécules d'eau si les trois atomes de chlore pointent vers l'entrée de la gorge. En conséquence, ceux-ci pointent vers le bas de la gorge et entraînent une rotation de 45° de la molécule (figure 52-A). Dans cette situation l'empilement aromatique n'est plus optimum et il n'y a plus de liaison hydrogène (figure 52-B). On pouvait s'attendre à une meilleure orientation du ligand en

absence du réseau complet de molécules d'eau d'autant que l'énergie de liaison prédit une excellente interaction (-9.0 kcal.mol^{-1}). Or, la position du ligand dans le site est encore moins adaptée puisqu'il effectue une rotation de 180° autour d'un axe vertical, la fonction trichloroacétimidate se retrouvant au niveau de la poche hydrophobe adapatée à l'atome de chlore. L'encombrement stérique du ligand n° 14 ne permet donc pas de l'envisager comme un agent alkylant potentiel.

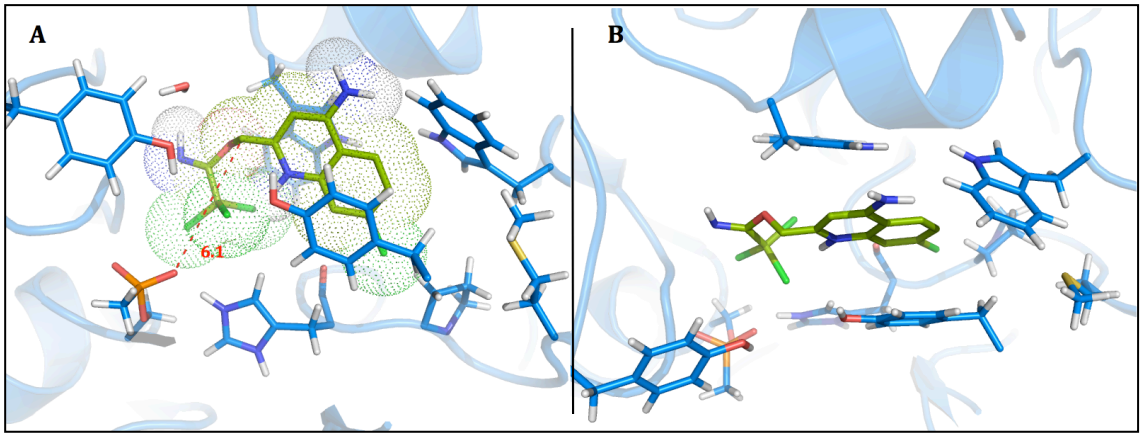
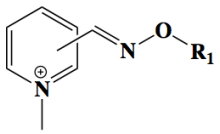
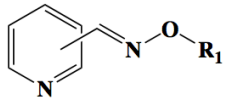


Figure 52 : Ligand n° 14 en vue de face (A) et vue de dessus (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés rouges.

4-3. Les ligands basés sur un noyau pyridinium

4-3-1 Les réactivateurs bifonctionnels à noyau pyridinium/pyridine





groupement R_1	Position de la fonction réactive sur un le noyau ***pyridinium***				Position de la fonction réactive sur le noyau ***pyridine***			
	n°	*ortho*	*n°*	*para*	*n°*	*ortho*	*n°*	*para*
methyl	101	**-6.7**	102	**-6.5**	201	**-7.2**	202	**-6.4**
ethyl	103	**-6.6**	104	**-6.7**	203	**-7.3**	204	**-6.9**
iso-butyl	105	**-6.4**	106	**-6.2**	205	**-7.6**	206	**-6.8**
benzyl	107	**-6.6**	108	**-6.9**	207	**-7.7**	208	**-6.8**
4-methoxybenzyl	109	**-4.6**	110	**-5.9**	209	**-5.3**	210	**-5.7**
2,4-dimethoxybenzyl	111	**-4.0**	112	**-2.8**	211	**-5.0**	212	**-4.7**
2,3,4,5,6-fluorobenzyl	113	**-4.8**	114	**-6.6**	213	**-6.3**	214	**-6.3**
4-nitrobenzyl	115	**-5.4**	116	**-4.6**	215	**-5.6**	216	**-6.2**

Tableau 53 : Variation d'énergie libre de liaison des réactivateurs bifonctionnels basés sur le noyau pyridinium (tableau 39, page 79), analysés par docking moléculaire dans le récepteur 2, en présence du réseau d'eau complet.

4-3-1-1 …. en fonction du noyau

De manière générale, les réactivateurs bifonctionnels de la « série 200 », c'est-à-dire basés sur le noyau pyridine, non chargé, possèdent une énergie de liaison légèrement plus favorable que leurs équivalents basés sur le noyau méthylpyridinium. Cela s'explique par l'encombrement supplémentaire créé par le groupement méthyle pour la « série 100 ». Malgré cette énergie de liaison légèrement plus favorable, les ligands de la « série 200 » n'adoptent pas forcément une position plus adaptée à l'alkylation.

4-3-1-2 …. en fonction de la position de la chaine réactive sur le noyau

Aucune règle ne se dessine quant à l'influence de la position de la chaine réactive en ortho ou en para du pyridinium sur la liaison du ligand dans le récepteur, énergie de liaison et position confondues.

En effet, les valeurs de ΔG pour les ligands dont la fonction est en position ortho semble légèrement meilleures, sans que cela ne traduise nécessairement une meilleure position dans le site actif.

On note que les variations d'énergie pour deux ligands, dont la seule différence tient de position de la fonction réactive en ortho ou en para, restent assez faibles. Elles sont d'environ **0.3 kcal.mol^{-1}** pour les ligands n° 101 à 106 (noyau méthylpyridinium ; R1: chaîne carbonée) et n° 207 à 216 (noyau pyridine ; R1: cycle substitué) et d'environ **1.1 kcal.mol^{-1}** pour les ligands n° 107 à 116 (noyau méthylpyridinium ; R1: cycle substitué) et n° 201 à 206 (noyau pyridine ; R1: chaîne carbonée).

4-3-1-3 …. en fonction du groupement masquant la fonction oxime

Des trois variables testées, la nature du groupement porté par la fonction oxime, qui doit servir de groupement alkylant pour le méthylphosphonate est celle qui a le plus d'influence quant au choix des ligands d'intérêt pour notre problématique.

Deux types de groupement sont ici envisagés : des chaînes carbonées aliphatiques, ramifiées ou non et des cycles benzéniques, substitués ou non.

Globalement, la complexation des ligands dans le récepteur voit son énergie de liaison augmenter (~ +2 kcal.mol^{-1}) avec l'encombrement stérique du groupement R_1. Cela s'explique simplement par la place limitée dans le site actif. Néanmoins, malgré une affinité modérée de ces ligands, certains se positionnent de manière particulièrement favorable à la réaction recherchée.

Pour les ligands de la « série 100 », le méthyle porté par le noyau pyridinium a tendance à se loger dans la poche hydrophobe formée par la Met443, Trp439 et Pro446. Les ligands portant la chaine réactive en para du noyau méthylpyridinium se positionnent plus favorablement dans le site actif que ceux portant la chaine réactive en ortho, leur carbone réactif étant bien dirigé vers le méthylphosphonate (figure 54-A). Les noyaux pyridinium de l'ensemble de ces ligands sont superposables, et sont stabilisés par stacking et interaction cation-π entre Tyr337

et Trp86. Les groupements R_1 aromatiques substitués, ou non, pointent vers le bas de la gorge (exemple, figure 54-B).

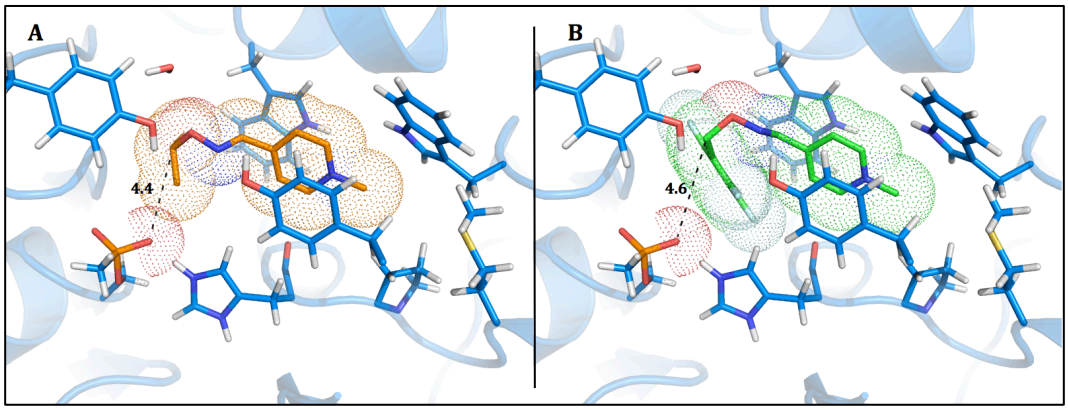


Figure 54 : Ligands n° 106 (A) et n° 114 (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

Pour les ligands n° 101 à 104, plus petits, le mode de liaison est moins prévisible. Le ligand n° 103 apparaît comme le meilleur candidat réactivateur bifonctionnel de la « série 100 » alliant affinité de l'ordre du micromolaire et proximité entre son carbone réactif et l'oxygène du phosphonyle (3.8 Å) (figure 55).

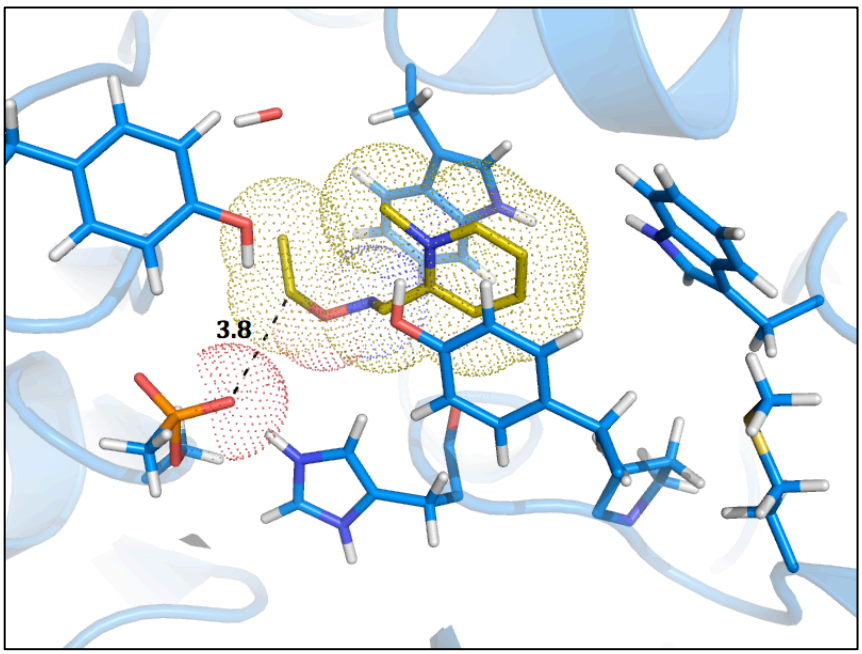


Figure 55 : Ligand n°103 dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

Les ligands de la « série 200 » dont le groupement R_1 est un diméthoxybenzyle (ligands n° 211 et n°212) ou un nitrobenzyle (ligands n° 215 et n°216) se fixent de manière totalement inadaptée (rotation de 180° selon l'axe verticale). Pour les autres molécules, aucune des deux positions ortho ou para ne semble plus favorisée que l'autre, du fait de l'absence du méthyle sur l'azote du noyau pyridine. Comme pour la « série 100 », le cycle pyridine est stabilisé entre Tyr337 et Trp86 et le cycle benzénique pointe vers le bas. Plus le groupement R_1 est encombrant, plus les atomes réactifs sont éloignés. Ainsi, les ligands n° 203 et n° 205 sont d'un intérêt certain pour notre problématique puisqu'ils allient affinité de l'ordre du micromolaire et proximité des atomes réactifs (figure 56).

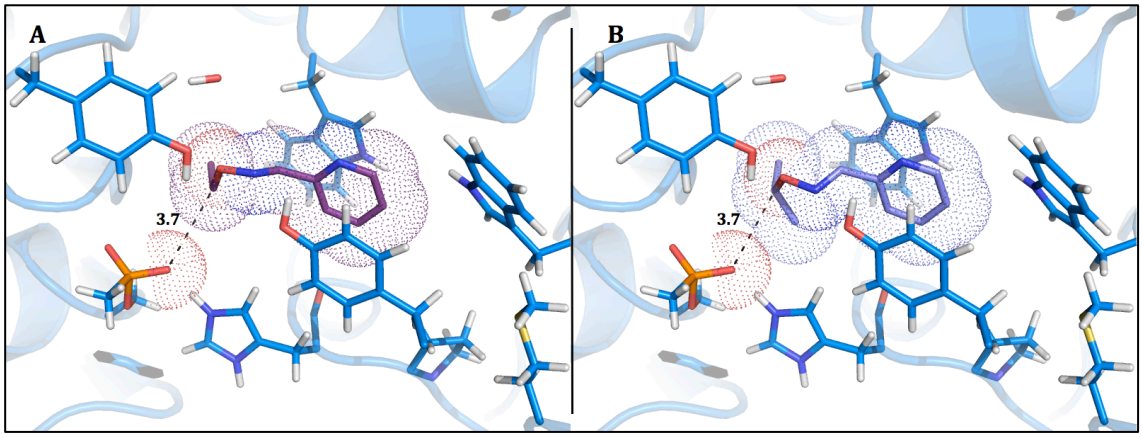
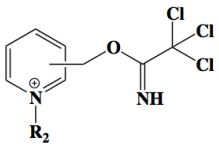
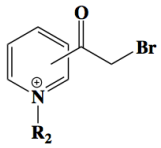


Figure 56 : Ligands n° 203 (A) et n°205 (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atome. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

Si on compare les valeurs de ΔG obtenues avec et sans le réseau complet de molécules d'eau, on constate que l'énergie de liaison augmente en valeur absolue avec l'encombrement stérique du groupement R_1 en absence de molécules d'eau, c'est-à-dire quand le degré de liberté augmente. L'augmentation du nombre d'interactions de van der Waals avec les résidus du site actif explique ce phénomène. Mais encore une fois, une bonne affinité ne correspond pas forcément dans ce cas à une orientation optimum pour l'alkylation. Au contraire, cette plus grande liberté conduit certains ligands à prendre des poses totalement inadaptées.

4-3-2 Les agents alkylants à noyau pyridinium





groupement R_2	Position de la fonction réactive sur le noyau pyridinium/pyridine									
	n°	*ortho*	*n°*	*para*	*n°*	*ortho*	*n°*	*meta*	*n°*	*para*
H					219	**-6.9**	220	**-6.9**	221	**-6.7**
methyl	117	**-6.6**	118	**-7.2**	119	**-6.5**	120	**-6.3**	121	**-6.4**
benzyl	317	**-2.2**	318	**-3.7**	319	**-6.4**	320	**-5.9**	321	**-6.1**

Tableau 57 : Variation d'énergie libre de liaison des agents alkylants basés sur le noyau pyridinium (tableau 39, page 79), analysés par docking moléculaire dans le récepteur 2, en présence du réseau d'eau complet.

4-3-2-1 …. portant une fonction trichloroacétimidate

Pour ces ligands de taille importante, la position en ortho ou para a un effet important sur leur énergie d'interaction et sur leur mode de liaison . En effet, seul le noyau pyridinium du ligand n° 317 est stabilisé par Tyr337 et Trp86 alors que le benzyle pointe vers l'entré de la gorge sans former d'interaction spécifique (figure 58-A). En revanche, le ligand n° 318 plus linéaire est capable d'interagir à la fois avec Trp86 via son pyridinium et Tyr337 via son benzyle (Figure 58-B). Ceci explique une énergie de liaison plus favorable (-3.7 kcal.mol^{-1}) que celle du ligand n° 317 (-2.2 kcal.mol^{-1}), même si dans les deux cas, elle reste très faible étant donné les conflits stériques résultant de la présence des cycles aromatiques et du groupement C-Cl_3. Quoiqu'il en soit, le carbone électrophile des deux ligands est trop éloigné de l'oxygène du phosphonate.

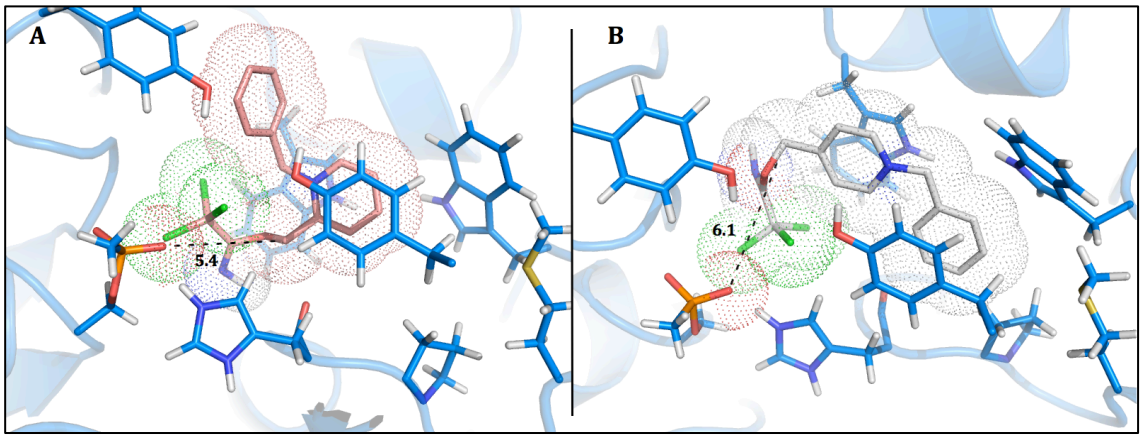


Figure 58 : Ligands n° 317 (A) et n° 318 (B) dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

Le remplacement du benzyle par un méthyle donne une situation plus favorable puisque les énergies de liaison indique une affinité de l'ordre du micromolaire (-6.6 kcal.mol^{-1} et -7.2 kcal.mol^{-1}). Les deux molécules se positionnent de manière identique dans le récepteur, stabilisées majoritairement par le stacking aromatique, et dans une moindre mesure, par des interactions entre le méthyle du pyridinium et la poche hydrophobe pour le ligand n° 118. Une fois de plus, leur position dans le site actif ne permet pas de rapprocher le carbone électrophile de l'oxyanion du phosphonate (6.3 Å).

4-3-2-2 …. portant une fonction bromoacétyle

Quel que soit la position du groupement réactif bromoacétyle (en ortho, meta ou para du noyau pyridinium) et la nature du groupement R_2 (H, méthyle ou benzyle), l'énergie de liaison se situe autour de 6 ± 1 kcal.mol^{-1}, soit une affinité correcte de l'ordre de la dizaine de micromolaire. Néanmoins, aucun des neufs ligands de cette série ne se positionne de manière favorable à l'alkylation. Soit le ligand a sa fonction alkylante orientée vers la poche hydrophobe du chlore (ligands n° 120, 220 et 221), soit le carbone électrophile se situe à une distance supérieure à 4.5 Å de l'oxygène du phosphonate. Seul ligand n° 320 apparaît alors comme un candidat intéressant pour notre objectif puisque les atomes réactifs sont alignés et distants de 4.0 Å (figures 59 et 60).

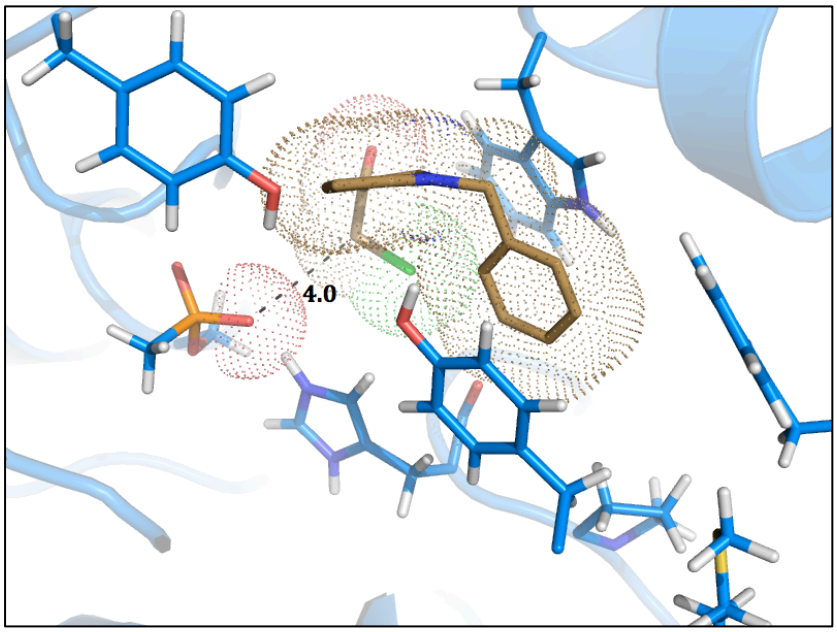


Figure 59 : Ligand n° 320, en vue de haut, dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

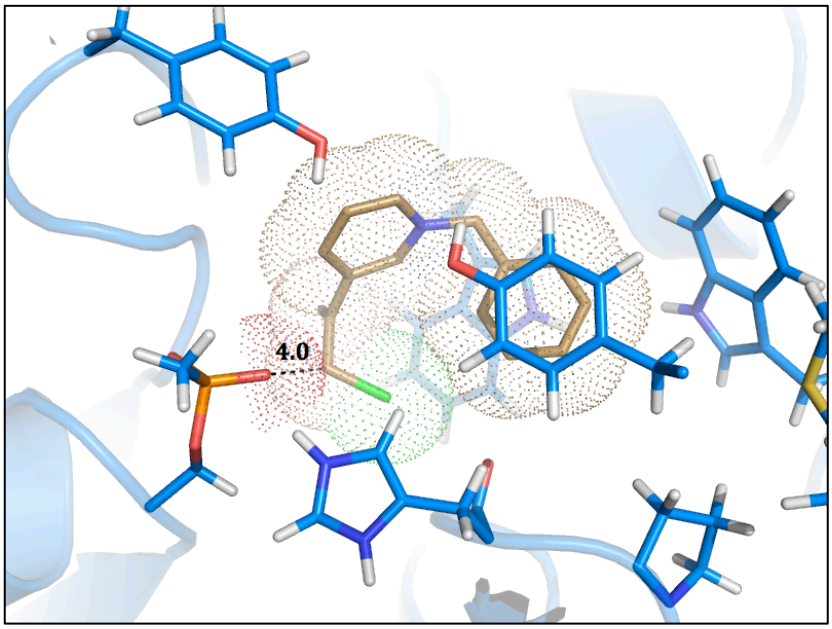


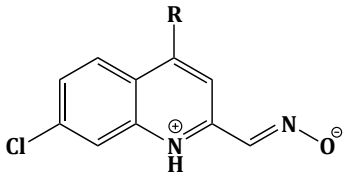
Figure 60 : Ligand n°320, en vue de face, dans le site actif du récepteur 2, d'après le docking moléculaire. Pour la protéine, les atomes de carbone sont en bleu clair, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu foncé, d'hydrogène en blanc, et de phosphore en orange. Le volume occupé par les atomes est représenté par des points colorés en fonction du type d'atomes. Les distances d'intérêt entre atomes sont représentées en pointillés noirs.

5. Conclusions

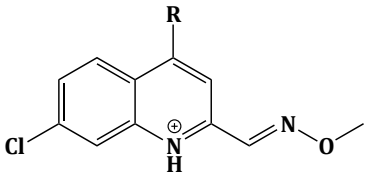
5-1. Les ligands basés sur un noyau chloroquinoline

La diversité des fonctions réactives ne semblent pas influencer l'orientation du ligand dans le site actif ce qui suggère que le noyau chloroquinoline impose des contraintes suffisantes pour contrôler l'orientation de ces ligands. Pour chacun d'eux, la fonction alkylante se positionne à proximité du méthylphosphonate. Néanmoins, la distance et l'orientation de cette fonction ne sont pas toujours compatibles avec la formation d'une liaison covalente entre l'oxygène du phosphonate et l'atome de carbone électrophile de la fonction alkylante.

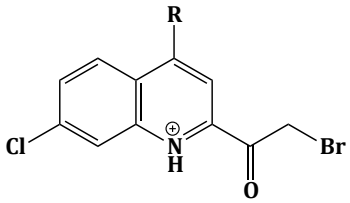
Les réactivateurs bifonctionnels, dont l'oxime est méthylée, et l'oxime correspondante, tout comme les agents portant la fonction alkylante bromoacétyle combinent les caractéristiques requises aussi bien en terme d'affinité que d'agencement favorable à l'alkylation.



ligands n°01,21



ligands n°02,22



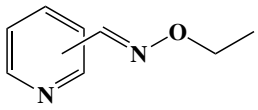
ligands n°12,32

avec R, groupement amine ou hydroxyle

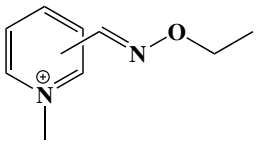
5-2. Les ligands basés sur un noyau pyridinium

Le type de fonction réactive et sa position sur le noyau pyridinium ne constituent pas un critère sur lequel sélectionner les réactivateurs bifonctionnels potentiels. La nature du groupement R_1 est finalement plus importante car elle conditionne l'encombrement stérique du ligand dans le site actif. Il en ressort que les réactivateurs bifonctionnels dont l'oxime est masquée par un groupement éthyle ou isobutyle apparaissent comme les plus prometteurs.

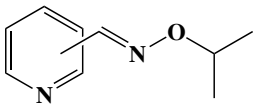
Parmi les agents alkylants simples, la fonction bromoacétyle semble la plus propice à notre objectif, notamment lorsqu'elle est en meta du benzylpyridinium (ligand n°320).



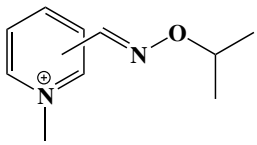
ligands n°203, 204



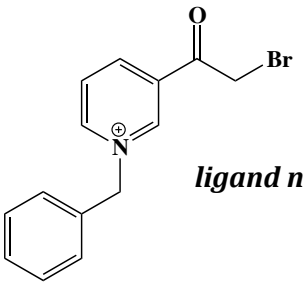
ligands n°103, 104



ligands n°205, 206



ligands n°105, 106

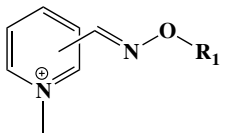


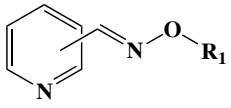
ligand n°320

Ces éléments de sélection ne sont basés que sur des modélisations théoriques. Seules les évaluations *in vitro* nous permettrons de confirmer la pertinence de ces choix et l'intérêt de ces molécules dans le cadre de notre objectif : réalkyler un conjugué d'hAChE vieillie pour le rendre à nouveau réactivable par les oximes.

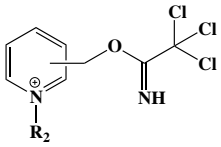
CHIMIE

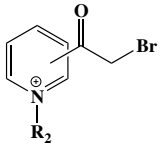
Sur les 45 réactivateurs bifonctionnels et agents alkylants basés sur le noyau pyridinium testés en docking moléculaire, 32 ont été synthétisés par nos collaborateurs néerlandais (tableau 61). Leur synthèse ne sera pas décrite dans ce manuscrit. Ces candidats seront évalués pour leur activité biologique par mesure cinétique et/ou analyse structurale.





groupement R_1	Position de la fonction réactive sur un le noyau ***pyridinium***		Position de la fonction réactive sur le noyau ***pyridine***	
	ortho	*para*	*ortho*	*para*
methyl	101	102		
ethyl	103	104		
iso-butyl	105	106		
benzyl	107	108	207	208
4-methoxybenzyl	109	110	209	210
2,4-dimethoxybenzyl	111	112		
2,3,4,5,6-fluorobenzyl	113	114	213	214
4-nitrobenzyl	115	116	215	





groupement R_2	Position de la fonction réactive sur le noyau pyridinium/pyridine				
	ortho	*para*	*ortho*	*meta*	*para*
H				220	
methyl	117	118		120	121
benzyl	317	318		320	321

<u>Tableau 61</u> : Réactivateurs bifonctionnels et agents alkylants, basés sur le noyau pyridinium, synthétisés par nos collaborateurs néerlandais.

Mon travail a consisté à synthétiser certains des candidats dérivés du noyau chloroquinoline. J'ai pu obtenir le **7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime** (« 2-méthyl aldoxime-HQ », ligand n° 22) et le **4-amino-7-chloroquinoline-2-carbaldéhyde oxime** (« 2-carbaldéhyde oxime-AQ », ligand n° 01). La synthèse d'un troisième ligand, l'agent alkylant **4-amino-2-bromoacétyl-7-chloroquinoline** (ligand n° 32) a été entamée mais non achevée, la dernière étape de bromation n'ayant pas eu le succès escompté.

1. Synthèse du « 2-methyl aldoxime HQ »

Le 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime ou « 2-méthyl aldoxime-HQ » (figure 62) est un réactivateur bifonctionnel basé sur le noyau chloroquinoline et dont la fonction oxime est masquée par un groupement méthyle, faisant office de fonction alkylante.

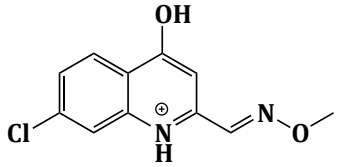


Figure 62 : Structure chimique du 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime ou « 2-méthyl aldoxime-HQ »

La première étape de cette synthèse est une condensation cyclique entre le diéthyloxaloacétate et la 3-chloroaniline, comme décrit par Surrey (Surrey and Hammer 1946) (schéma 63) aboutissant à la formation de l'intermédiaire 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-éthylcarboxylate.

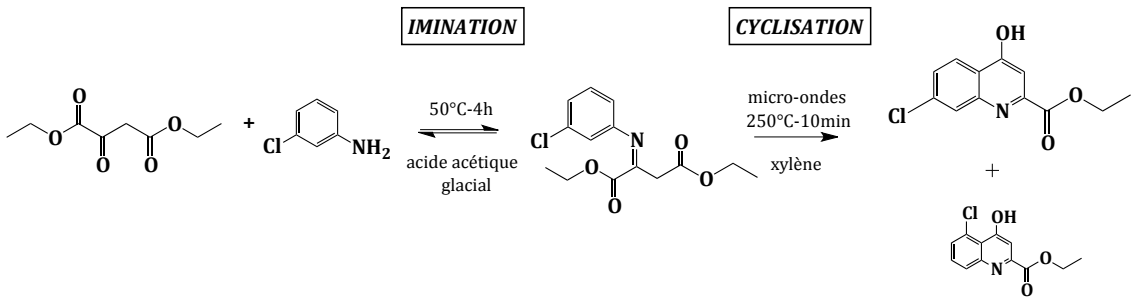


Schéma 63 : Condensation cyclique du diéthyloxaloaétate et de la 3-chloroaniline aboutissant à la formation des intermédiaires 5 et 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-éthylcarboxylate.

Celle-ci se déroule en deux temps, avec une étape d'imination puis une étape de cyclisation par micro-ondes (De Paolis, Teixeira *et al.* 2009) en remplacement du

bain d'huile à 250°C (Surrey and Hammer 1946). La présence de deux carboxylates d'éthyle de réactivité identique sur le diéthyloxaloacétate conduit à deux produits de cyclisation, avec l'atome de chlore en position 5 ou 7 de la chloroquinoline.

Différentes conditions d'irradiation aux micro-ondes ont été testées afin d'optimiser le rendement de cyclisation sans dégrader le produit de départ (P.D.) (tableau 64). Cette première étape utilise des réactifs commerciaux, ce qui compense les rendements médiocres obtenus (quelques %). Nos recherches dans la littérature n'ont pas permis de mettre en évidence une voie de synthèse alternative pour cette chloroquinoline, dont le rendement aurait pu être meilleur.

Conditions d'irradiation		Solvant	Observations
température (°C)	durée (min)		
130	1	-	P.D.
170	25	-	P.D
200	25	-	précipité jaune (dégradation) + P.D.
200	25	CH_2Cl_2	P.D. + dégradation + produits
25 → 250	8	xylène	produits + impuretés
250	10		

Tableau 64 : Conditions testées pour la cyclisation du 5/7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-éthylcarboxylate.

Dans nos conditions de purification sur colonne de silice, la séparation totale des deux isomères n'est pas possible car leur facteur de rétention (R_f) sont très proches. Deux fractions sont obtenues lors de cette étape : une fraction contenant l'isomère dont le chlore est en position 7 et une fraction contenant les deux isomères. La séparation des isomères sera possible à une étape plus tardive dans la voie de synthèse. Les réactions qui suivent ont été réalisées sur le mélange des 2 isomères.

La fonction ester portée par le squelette 5/7-chloro-4-hydroxyquinoline est ensuite saponifiée en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (schéma 65).

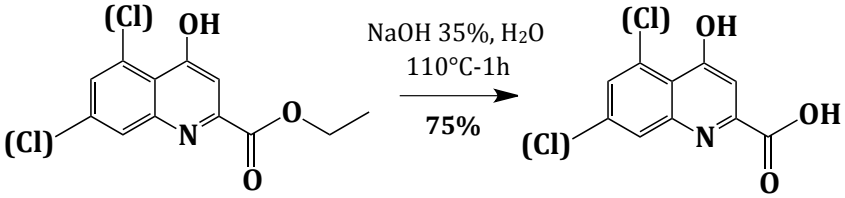


Schéma 65 : Hydrolyse de la fonction éthylcarboxylate en fonction acide carboxylique sur le squelette 5/7-chloro-4-hydroxyquinoline.

Après réaction, le retour a un pH acide (~ 2) dans le milieu réactionnel entraîne la formation du sel du produit attendu (un mélange d'acides 5- et 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carboxylique) qui précipite et peut être purifié par simple filtration.

La fonction acide carboxylique est ensuite réduite en fonction aldéhyde (schéma 66).

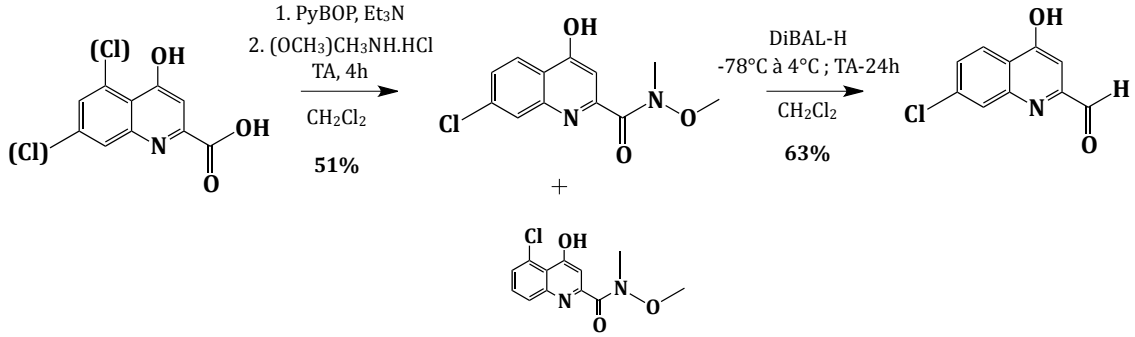


Schéma 66 : Réduction de la fonction acide carboxylique en fonction aldéhyde, par un intermédiaire amide de Weinreb, sur le squelette 7-chloro-4-hydroxyquinoline.

Pour contrôler cette réduction, et ne pas obtenir la fonction alcool primaire, la fonction acide carboxylique est d'abord transformée en fonction « amide de Weinreb », du nom du chimiste américain S.M. Weinreb qui les a introduites en tant qu'intermédiaire de synthèse dans la chimie organique moderne, dans les années 80 (Nahm and Weinreb 1981).

La préparation de cet intermédiaire nécessite l'activation de la fonction acide carboxylique. Différentes réactions on été décrites (De Luca, Giacomelli *et al.* 2001) (Kangani, Kelley *et al.* 2006). Dans notre cas, l'acide carboxylique est activé par le PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), initialement employé comme réactif de couplage dans la synthèse peptidique

(Frerot, Coste *et al.* 1991). En présence d'une base, la triéthylamine (Et_3N), la réaction entre la fonction acide et le PyBOP conduit à la formation d'un intermédiaire acylphosphonium instable, qui réagit immédiatement avec un nucléophile, l'amine N,O-diméthylhydroxylamine [$(OCH_3)CH_3NH.HCl$], pour donner l'amide de Weinreb correspondante (schéma 67).

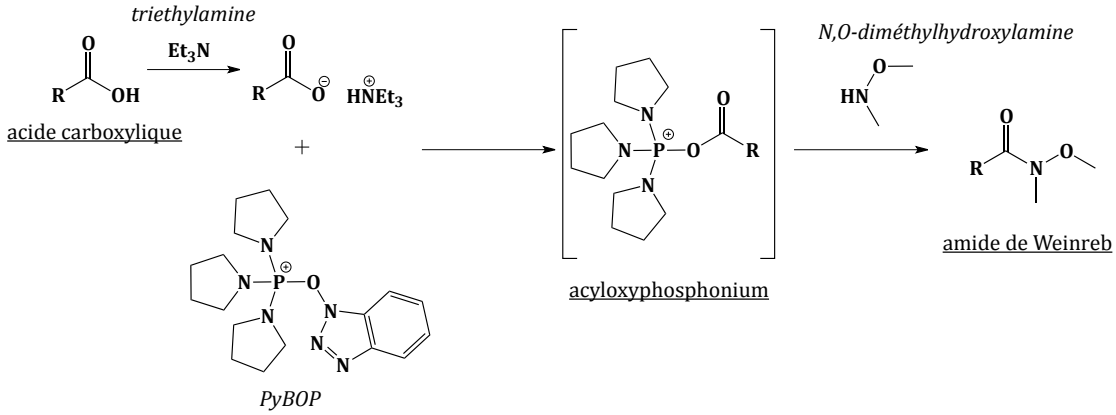


Schéma 67 : Formation d'une amide de Weinreb à partir d'un acide carboxylique activé par le PyBOP, en présence de triéthylamine

A cette étape, les deux isomères portant le chlore en postion 5 et 7 sont séparables sur colonne de silice. La suite de la synthèse ne s'effectue alors que sur l'isomère d'intérêt, celui portant le chlore en position 7.

La fonction aldéhyde est obtenue par réduction de la fonction amide par le DiBAL-H (hydrure de diisobutylaluminium). Ce réducteur est connu depuis longtemps, notamment pour réduire la fonction acide carboxylique en aldéhyde (Zakharkin and Khorlina 1962). Cette réaction doit être rigoureusement contrôlée afin d'éviter une réduction de l'aldéhyde en alcool, d'où l'intérêt de travailler avec un intermédiaire amide de Weinreb.

Un autre réducteur, le borohydrure de sodium ($NaBH_4$) a également été testé à la place du DiBAL. Au cours de la réaction, l'amide a subit une double réduction pour conduire à l'alcool primaire, et ce malgré la présence de la fonction amide de Weinreb.

La dernière étape de cette voie de synthèse consiste en la fonctionnalisation du squelette 7-chloro-4-hydroxychloroquine par une fonction méthylaldoxime, afin d'obtenir notre réactivateur bifonctionnel potentiel portant une fonction oxime masquée par un groupement méthyle. La réactivité de la fonction aldéhyde ne

nécessite que la présence du nucléophile, le méthylhydroxylamine dans notre cas, pour obtenir, par catalyse acide, la fonctionnalité correspondante, l'oxime méthylée (schéma 68).

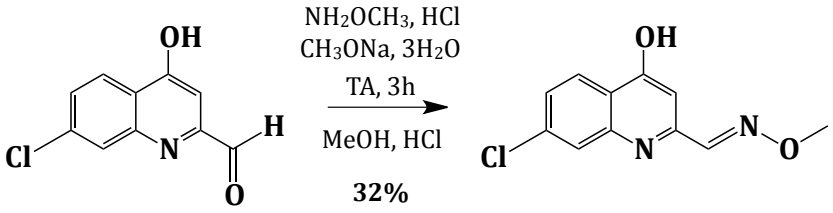


Schéma 68 : Fonctionnalisation de la fonction aldéhyde en fonction méthylaldoxime, sur le squelette 7-chloro-4-hydroxyquinoline.

2. Synthèse du « 2-carbaldéhyde oxime AQ »

La 7-chloro-4-aminoquinoline-2-carbaldéhyde oxime ou « 2-carbaldéhyde oxime-AQ » (figure 69) est une oxime simple, basée sur le noyau chloroquinoline. Sa synthèse a été motivée par la nécessité de contrôler l'efficacité de cette oxime sur l'hAChE inhibée mais non vieillie, afin de vérifier la pertinence de synthétiser son dérivé méthylé, formant le réactivateur bifonctionnel (fonction oxime masquée par la fonction alkylante).

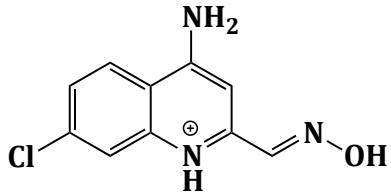


Figure 69 : Structure chimique du 7-chloro-4-aminoquinoline-2-carbaldéhyde oxime ou « 2-carbaldéhyde oxime-AQ »

La première étape de synthèse consiste en la condensation du 4-amino-2-chlorobenzonitrile et de l'acétone en présence de chlorure de zinc ($ZnCl_2$) (Goncharenko, Kaganskii *et al.* 1992) afin d'obtenir directement le squelette 4-amino-7-chloroquinoline méthylé en position 2 (schéma 70).

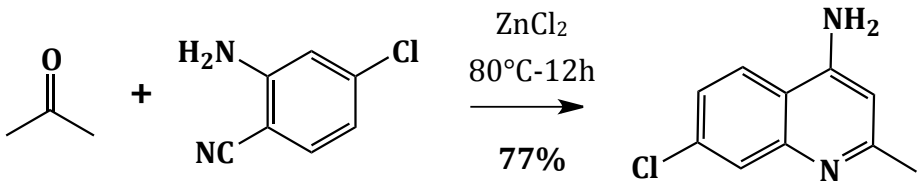


Schéma 70 : Formation du noyau 4-amino-7-chloroquinoline par condensation de l'acétone et du chlorobenzonitrile.

Le chlorure de zinc intervient dans la réaction en tant qu'acide de Lewis modéré, accepteur du doublet d'électrons de l'azote du groupement cyano. De par cette propriété, il engendre la formation du deuxième cycle après l'attaque nucléophile de l'amine du 4-amino-2-chlorobenzonitrile sur le carbonyle de l'acétone. L'acétone joue le rôle de réactif mais également de solvant d'où son large excès par rapport au benzonitrile.

Il a été observé que le 4-amino-7-chloroquinoline-2-méthyle s'isomérisait, d'après les spectres RMN (schéma 71).

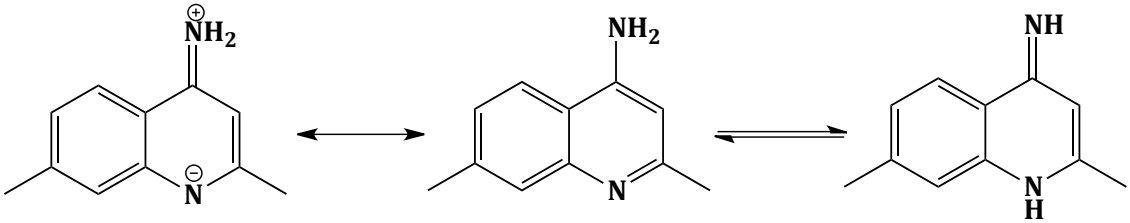
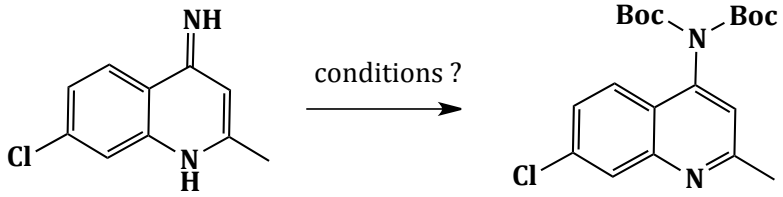


Schéma 71 : Isomérisation du 4-amino-7-chloroquinoline-2-méthyle

Ainsi, pour conserver l'aromaticité du squelette dans les étapes suivantes de la synthèse, le groupement amine est substitué par deux groupements protecteurs *tert*-butyloxycarbonyle (« Boc »). Ces groupements sont utilisés, entre autre, en synthèse peptidique pour protéger les fonctions amines. Plusieurs conditions (tableau 72) ont été testées afin d'optimiser cette protection et d'obtenir deux groupements Boc sur la fonction amine.



Réactifs	Eqv	Conditions réaction	Solvant	Produits	Rendement	
NaH Boc2O	1 1	TA – 24h	DMF	2-méthyl-AQ (« mono Boc »)	**25%**	
				2-méthyl-AQ (« bis Boc »)		
NaH DMAP Boc2O	2 2 2	TA – 24h	DMF	2-méthyl-AQ (« mono Boc »)	> 90%	**69%**
				2-méthyl-AQ (« bis Boc »)	<10%	
NaH DMAP Boc2O	3 3 3	TA – 7h	DMF	2-méthyl-AQ (« bis Boc »)	**81%**	

Tableau 72 : Conditions de réaction dans la protection du « 2-méthyl-AQ ». (NaH: hydrure de sodium ; Boc2O: ditertbutyl-dicarbonate ; DMAP: diméthylaminopyridine ; DMF: diméthylformamide ; TA: température ambiante)

Le DMAP permet d'activer le terbutyl-dicarbonate afin de favoriser sa réaction avec le groupement amine du « 2-méthyl-AQ ».

Après avoir protégé le groupement amine en position 4 du squelette chloroquinoline, le méthyle en position 2 est oxydé en aldéhyde. Nous souhaitions obtenir le « 2-carbaldéhyde-AQ » en deux étapes, une oxydation du méthyle par le peroxyde d'hydrogène suivi d'un réarrangement en présence d'anhydride acétique (Boekelheide and Linn 1954). Malheureusement, le solvant étant l'acide acétique, les groupements protecteurs ont été hydrolysés. C'est donc le produit de départ

que l'on retrouve majoritairement La même réaction sur le « 2-carbaldéhyde-AQ » non protégé a conduit aux mêmes observations.

Nous avons donc choisi d'oxyder le groupement méthyle en position 2 par le dioxyde de sélénium (SeO_2) (Ito and Maruyama 1983 ; Shembekar, Chen *et al.* 2005) selon le schéma réactionnel 73.

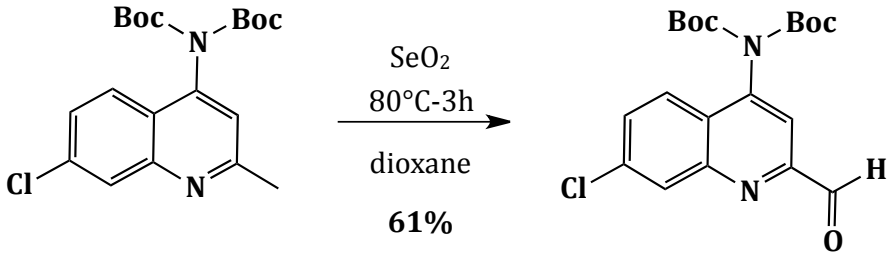


Schéma 73 : Oxydation du groupement méthyle en position 2 du « 2-méthyl-AQ » protégé, en fonction aldéhyde.

A partir de la fonction aldéhyde en positon 2 du squelette 4-amino-7-chloroquinoline, la fonctionnalisation de la molécule en oxime est possible en faisant réagir l'hydroxylamine correspondante (schéma 74). La déprotection de l'amine en position 2 est réalisée en milieu acide, par le trifluoroacétique. On obtient ainsi le « 2-carbaldéhyde oxime-AQ ».

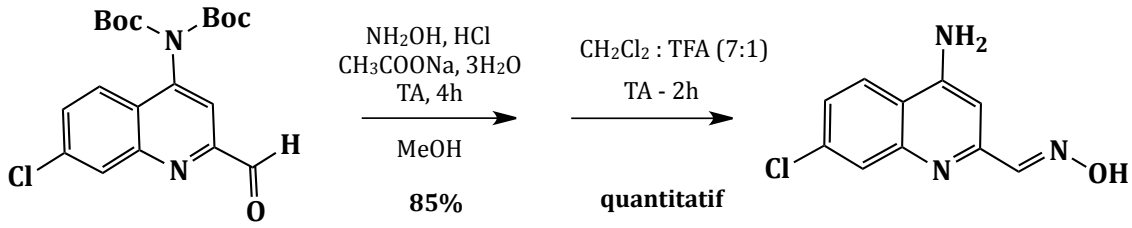


Schéma 74 : Fonctionnalisation et déprotection du squelette 4-amino-7-chloroquinoline en oxime.

3. Synthèse du « 2-bromoacétyl-AQ »

Initialement, la stratégie consistait à obtenir le 4-amino-2-bromoacétyl-7-chloroquinoline (« 2-bromoacétyl-AQ ») en deux étapes. En effet, l'acétone de la première étape de synthèse du « 2-carbaldéhyde oxime-AQ » a été remplacée par du butanedione pour conduire directement à la formation d'une fonction cétone (schéma 75), sachant que les deux carbonyles sont équivalents.

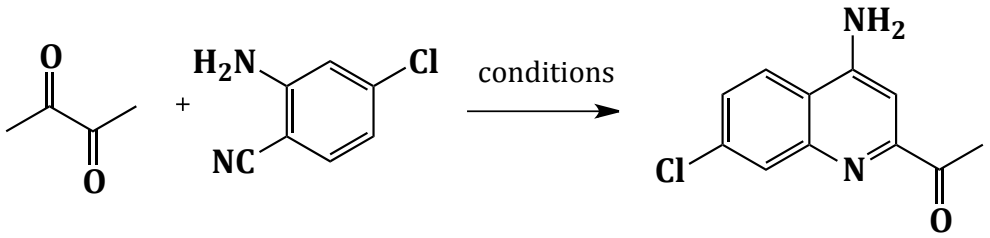


Schéma 75 : Condensation cyclique du butanedione et du 4-amino-2-chlorobenzonitrile conduisant à la formation du 4-amino-2-éthanone-7-chloroquinoline (« 2-éthanone-AQ »).

Plusieurs conditions de réaction ont été testées (tableau 76) mais aucune n'a conduit au produit attendu.

Conditions	Réactifs	Conditions de réaction	Solvant	Observations
1	$ZnCl_2$	50°C (reflux) – 24h	CH_2Cl_2	pâte noire P.D.
2	$ZnCl_2$	50°C (reflux) – 24h	THF	P.D.
3	$AlCl_3$	90°C (reflux) – 12h	$CH_3CH_2Cl_2$	P.D.

Tableau 76 : Conditions de réaction testées pour l'obtention du 4-amino-2-éthanone-7-chloroquinoline (« 2-éthanone-AQ »).(P.D.: produit de départ ; THF : tétrahydrofuranne)

C'est pourquoi, le « 2-éthanone-AQ » est finalement synthétisé en utilisant le protocole de la voie de synthèse du « 2-carbaldéhyde oxime-AQ ». Sur le 4-amino-2-carbaldéhyde-7-chloroquinoline, on fait réagir l'organomagnésien, CH_3MgBr, afin d'obtenir la fonction alcoolate en position 2, puis l'alcool secondaire par hydrolyse acide. L'ajout d'HCl dans le milieu réactionnel a entraîné la perte d'un groupement « Boc ». Néanmoins, le composé obtenu, le 4-amino-2-éthanol-7-chloroquinoline a conservé son aromaticité.

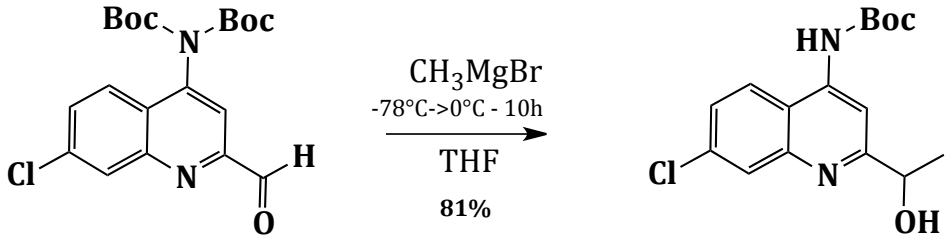


Schéma 77 : Syntèse du « 2-éthanol-AQ » à partir du « 2-carbaldéhyde-AQ » en présence de CH_3MgBr.

A partir de la fonction alcool secondaire, on obtient par oxydation par le MnO_2, en large excès, la fonction cétone (schéma 78).

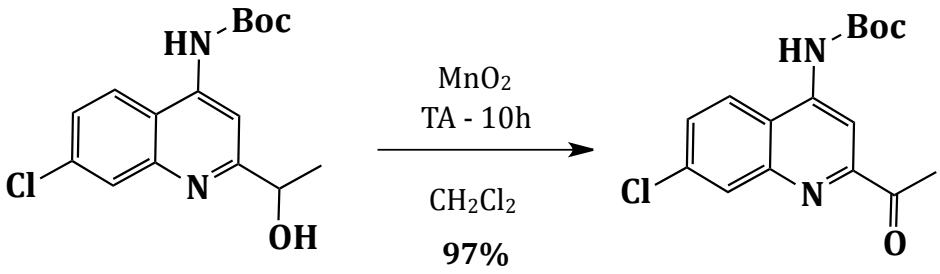
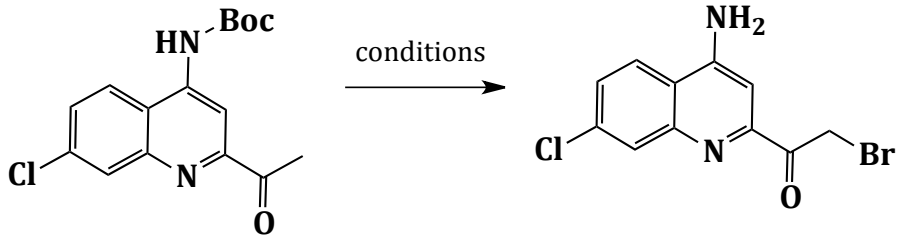


Schéma 78 : Oxydation du « 2-éthanol-AQ » par le dioxyde de manganèse conduisant à la formation du « 2-éthanone-AQ ».

Plusieurs réactions de bromation de la fonction cétone ont été envisagées et/ou réalisées pour conduire au produit final portant la fonction bromoacétyle (tableau 79). Malheureusement, à ce jour, aucune d'elle n'a connu le succès et le composé 4-amino-2-bromoacétyl-7-chloroquinoline n'a toujours pas été obtenu.



Réactifs	***Solvants***	***Conditions***	***Littérature***
$AlCl_3$ (excès) Br_2 (1eqv)	Et_2O	ajout sur 30min 0°C puis ↺ 10min	(Cowper and Davidson 1943)
	THF		(Park and Givens 1997)
$CuBr_2$ (1.7eqv)	AcOEt	1h – 80°C (reflux)	(King and Ostrum 1964) (*)
$TBABr_3$ (1eqv)	$CHCl_3$	↺ -TA	(Berthelot, Guette *et al.* 1989)
$PTABr_3$ (1eqv)	THF	ajout sur 10min 0°C puis ↺ 20min	(Jacques and Marquet 1988)
Br_2 (1.3 eqv) puis Diethylphosphite (0.8 eqv) + TEA (0.8 eqv)	$CHCl_3$ THF	15 min 0°C ⇨ TA + 10min - TA	(Xing, Pan *et al.* 2010)
NBS (1eqv)	-	20min - 120°C	(Pravst, Zupan *et al.* 2006)
NBS (1eqv) + PTSA (0.1eqv)	-	10min – 80°C	

Tableau 79 : Différentes possibilités de réaction de bromation sur une fonction cétone et les références littéraires correspondantes.
($TBABr_3$: tribromure de tétrabutylammonium ; $PTABr_3$: tribromure de phényltriméthylammonium ; NBS : N-bromosuccinimide ; PTSA : acide p-toluènesulfonique ; ↺ : agitation ; $CHCl_3$: trichlorométhane ; THF : tétrahydrofuranne ; Et_2O : éther ; AcOEt : acétate d'éthyle ; TEA : triéthylamine ; TA : température ambiante) ; (*) conditions testées.

EVALUATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Les ligands synthétisés, qu'ils soient basés sur le noyau chloroquinoline ou pyridinium, sont évalués tant sur leur affinité que sur leur capacité à réactiver l'hAChE.

Chacune des expériences s'effectue en utilisant l'hAChE recombinante produite et purifiée au laboratoire. Les tests de réactivité sont effectués sur l'hAChE inhibée, vieillie ou non. En revanche, pour des raisons développées ultérieurement, les tests d'affinité ont été réalisés sur l'hAChE native.

1. *Préliminaire*

1-1. Modèle cinétique de l'hydrolyse de substrat par l'hAChE

Le modèle cinétique classique est le modèle de Michaelis-Menten, pour lequel une molécule de substrat **S**, se fixe sur une molécule d'enzyme **E** avec une affinité représentée par la constante de Michaelis **Km** pour donner le complexe enzyme-substrat **ES**. La transformation du substrat en produit **P** a lieu à une vitesse définie par la constante catalytique **kcat** et conduit à la régénération de l'enzyme libre.

Pour les cholinestérases, le modèle est plus complexe. Une molécule de substrat se fixe au site actif avec une affinité $\mathbf{K_S}$. Une seconde molécule de substrat **Sp** peut se fixer au niveau du site périphérique avec une affinité spécifique **Kss** indépendante de la présence d'une première molécule de substrat dans le site actif.. La vitesse de la réaction catalytique est modifiée d'un facteur **b** lorsque cette seconde molécule de substrat est présente (schéma 80). On retrouve le modèle michaelien classique lorsque le facteur b est égal à 1.

L'hAChE possède un facteur b égal à 0.05 , ce qui signifie que la vitesse d'hydrolyse de la molécule de substrat présente dans le site actif est inhibée à 95 % lorsqu'une deuxième molécule est présente au niveau du site périphérique. Il y a inhibition par excès de substrat (plus la concentration en substrat est supérieure à Kss, plus la vitesse de catalyse est faible). Par opposition, la BChE suit un modèle d'activation par excès de substrat avec une valeur de facteur b d'environ 3.

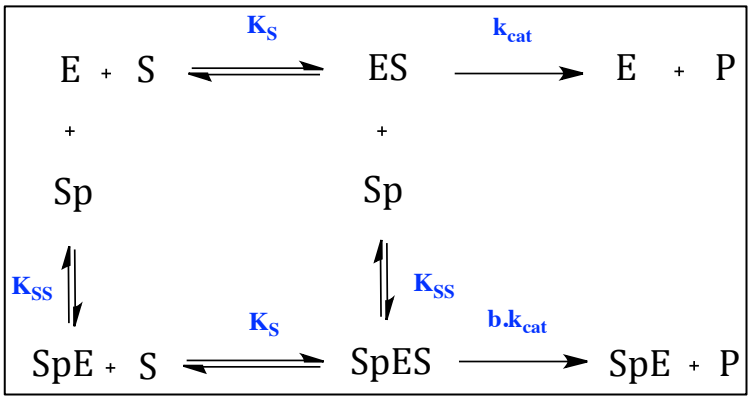


Schéma 80 : Modèle cinétique des cholinestérases (Marcel, Palacios et al. 1998)

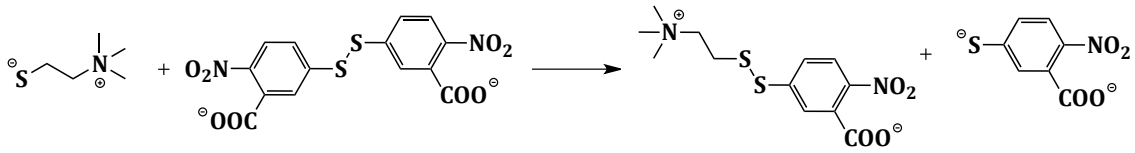
1-2. Mesure de l'activité cholinestérasique

La méthode d'Ellman (Ellman, Courtney *et al.* 1961) utilisée pour mesurer l'activité cholinestérasique est une méthode colorimétrique indirecte. En effet, on utilise un analogue du subtrat naturel de l'hAChE, l'acétylthiocholine (ATC), hydrolysée en acétate et thiocholine (figure 81).

acétylcholine **acétylthiocholine**

Figure 81 : Structure chimique de deux substrats de l'acétylcholinestérase.

L'acide 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) présent dans le milieu réactionnel est alors réduit par la thiocholine issue de l'hydrolyse enzymatique, et libère le thionitrobenzoate (TNB^-) qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 412 nm. C'est la variation de cette absorbance que l'on mesure pour déterminer l'activité de l'enzyme.



thiocholine **DTNB** **TNB^-**

1-3. Inhibition de l'hAChE par le VX

Certains tests de réactivation ont nécessité l'utilisation d'hAChE inhibée mais non vieillie. L'OP choisi pour l'inhibition est le VX car la réaction d'inhibition est rapide (1.2×10^{-8} $M^{-1}.min^{-1}$) mais le vieillissement est lent (0.019 h^{-1}) (Worek, Thiermann *et al.* 2004) pour un temps de demi-vie d'environ 37 heures, ce qui laisse le temps de manipuler les échantillons sans crainte de les voir vieillir.

On souhaite obtenir une inhibition de l'hAChE proche de 100 %, tout en éliminant le large excès de VX dans le mélange réactionnel. Lors d'une expérience de réactivation, cet excès pourrait ré-inhiber l'enzyme et biaiser les mesures de réactivation. Une méthode consiste à éliminer l'excès de VX par chromatographie d'exclusion à l'aide d'une colonne PD-10 (GE HealthCare®). Le gel Sephadex™ G-25 Medium qui les compose permet la séparation des molécules en fonction de leur taille, avec une limite d'exclusion à 5 kDa. Les molécules de poids moléculaire supérieur à 5 kDa sont excluent de la matrice et sont éluées dans le volume mort alors que les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 5 kDa pénètrent dans la matrice et possèdent un volume d'élution très supérieur au volume mort. En pratique, l'hAChE inhibée est récupérée dans le volume mort alors que l'excès de VX, qui n'a pu réagir, reste dans la colonne.

Le taux d'inhibition de l'hAChE par le VX atteint 99.8 % de l'activité initiale. Si le rendement de la chromatographie d'exclusion était de 100 %, une réactivation complète de l'enzyme conduirait à un retour à l'activité initiale, avant inhibition. Dans la pratique, le rendement de la chromatographie d'exclusion est généralement autour de 75 % mais reste peu reproductible. Il est alors difficile de prévoir à quelle valeur d'activité cholinestérasique correspond un taux de réactivation de 100 % de l'enzyme initialement inhibée. Cependant, nous savons qu'un réactivateur comme le HI-6 est capable de réactiver 100% de l'enzyme présente dans un échantillon. Nous avons donc utilisé cette propriété du HI-6 pour mesurer l'activité cholinestérasique de notre échantillon (E_{VX}), l'activité maximale obtenue (A_{max}) correspondant alors à un taux de réactivation de 100%. La figure 82 représente l'activité en fonction du temps de deux aliquots de l'échantillon E_{VX}, dilué au 1/40ème et réactivé en ajoutant 500 µM de HI-6 à t_0. Le test est dupliqué et l'effet de cycles de congélation/décongelation a été évalué sur un des aliquots.

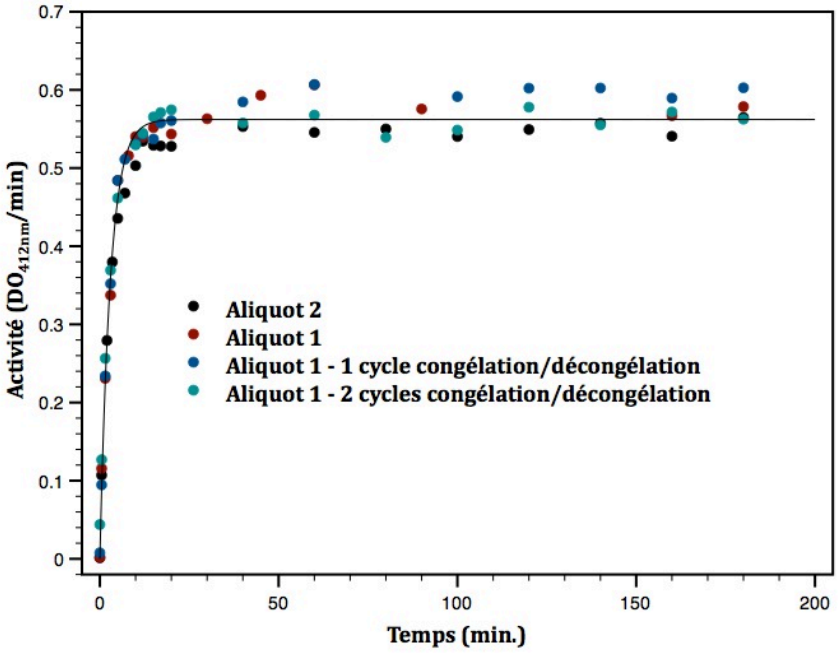


Figure 82 : Activité cholinestérasique résiduelle en fonction du temps lors de la réactivation de 42.5 nM d'hAChE inhibée au VX, par 500 µM de HI-6. (les 4 mesures réalisées correspondent à l'aliquot 1 sans (●), avec un (●) ou avec plusieurs (●) cycles de congélation/décongélation et l'aliquot 2 (●) sans cycle congélation/décongélation).

La réactivation par une oxime suit la loi exponentielle suivante:

$$A(t) = A_{\max} \cdot \left(1 - e^{-k_{app} \cdot t}\right) \qquad (1)$$

avec A(t), l'activité cholinestérasique résiduelle à un temps t ; A_{max}, l'activité maximale obtenue en fin de réactivation ; k_{app}, la constante de vitesse apparente de réactivation (min^{-1}) .

L'activité cholinestérasique maximale, A_{max}, et la constante de vitesse apparente de réactivation, k_{app}, sont déterminées par régression non linéaire à l'aide du logiciel pro Fit (QuantumSoft) en utilisant les données issues des 4 mesures indépendantes ainsi que l'équation (1).

On obtient k_{app} = **0.341 ± 0.011 min^{-1}** et A_{max} = **0.562 ± 0.003 ΔAbs/min**. La constante de vitesse de réactivation apparente est conforme à celle décrite dans la littérature pour une concentration de HI-6 de 500 µM (Worek, Reiter *et al.* 2002 ; Cochran, Kalisiak *et al.* 2011). A_{max} sera la valeur correspondante à une réactivation de 100% de l'activité cholinestérasique sachant que toutes les mesures de réactivation sont effectuées à l'aide de la même préparation d'enzyme inhibée.

2. Evaluation de l'affinité des ligands synthétisés

2-1. Les ligands basés sur le noyau chloroquinoline

2-1-1. Ligand n°22 : 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime

2-1-1-1. Mesure de la Concentration Inhibitrice à 50 % (IC_{50})

L'IC_{50} est une constante cinétique correspondant à la concentration nécessaire en ligand pour inhiber la moitié des molécules d'enzyme. La valeur d'IC_{50} est dépendante de la concentration en substrat utilisée lors de l'expérimentation. Ce paramètre est utile pour évaluer autour de quelles concentrations en inhibiteur il faut travailler pour mesurer une constante d'inhibition (Ki), indépendante de la concentration en substrat. L'activité cholinestérasique de l'hAChE est mesurée en fonction de la concentration en ligand présente dans le mélange réactionnel. La relation entre la concentration en inhibiteur et l'activité résiduelle est de nature hyperbolique:

$$\%Act = 100 \cdot \left(\frac{IC_{50}}{[I] + IC_{50}} \right) \qquad (2)$$

avec %Act, le pourcentage d'activité cholinestérasique résiduelle ; IC_{50}, la concentration à laquelle 50% de l'enzyme est inhibée; [I], la concentration en inhibiteur.

Pour le ligand n°22, l'IC_{50} est déterminée par régression non linéaire des activités résiduelles d'hAChE en présence de 1 mM d'ATC et de différentes concentrations du ligand n°22 à l'aide de l 'équation (2). On obtient une valeur d'IC_{50} = **73.0 ± 13.0 µM** (figure 83). Nous nous placerons dans cette gamme de concentration pour déterminer la constante d'inhibition Ki de ce ligand pour l'hAChE native.

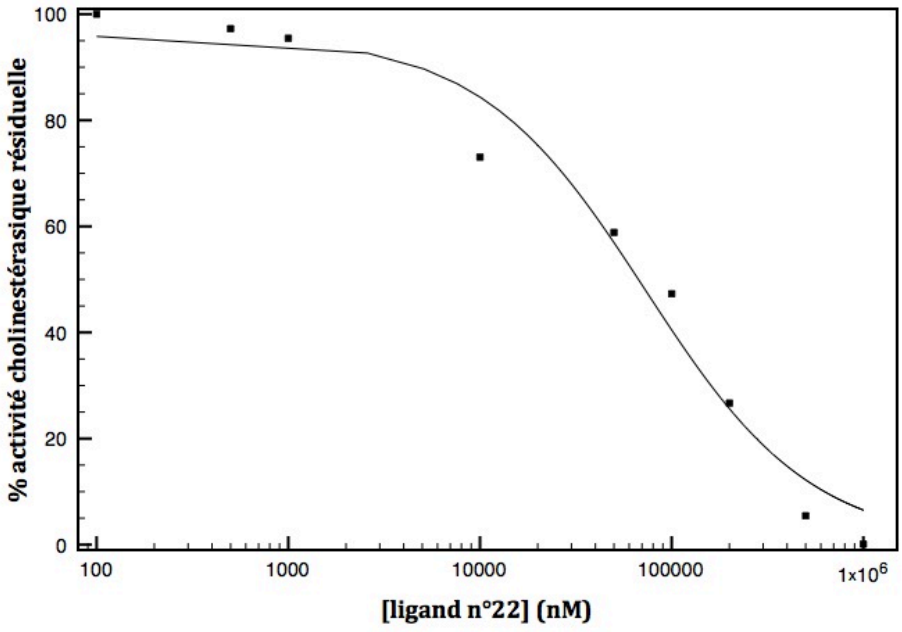


Figure 83 : Pourcentage de l'activité résiduelle de l'hAChE en fonction de la concentration en ligand n°22 (L'activité résiduelle de 10 nM d'hAChE est mesurée en présence d'1mM d'ATC et de différentes concentrations en ligand n°22. La courbe continue représente la régression non linéaire selon l'équation 2).

2-1-1-2. Mesure de la Constante d'Inhibition (Ki)

La liaison d'un ligand à une enzyme peut entraîner une modification de son activité. Ce ligand peut être un effecteur et augmenter l'activité de l'enzyme ou un inhibiteur et donc diminuer la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme. L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition Ki qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle le site de liaison de la moitié des molécules d'enzyme est occupé. L'affinité est d'autant plus grande que la valeur du Ki est petite. Ki est également la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

Les données expérimentales d'inhibition de l'hAChE native par le ligand n°22 suivent un profil d'inhibition non-compétitive (figure 85), décrit par le schéma 84 (Berman and Leonard 1992) et pour lequel l'inhibition par excès de substrat est négligeable.

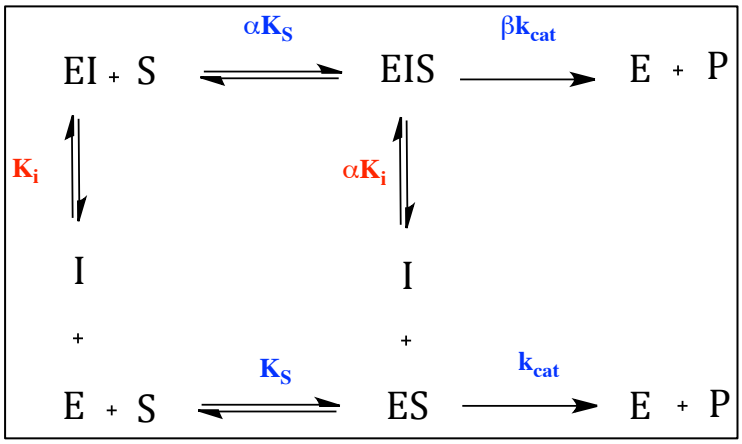


*Schéma 84 : Modèle cinétique d'inhibition des cholinestérases par un ligand non covalent. (avec **[E]**, **[S]** et **[ES]**, respectivement le substrat, l'enzyme libre, le complexe enzyme-substrat et **[P]**, le produit d'hydrolyse. En présence d'inhibiteur **[I]**, deux complexes non covalents peuvent se former, **[EI]**, le complexe enzyme-inhibiteur et **[EIS]**, le complexe ternaire enzyme-substrat-inhibiteur. **Ks** et **Ki** sont respectivement les constantes de dissociation du substrat et de l'inhibiteur vis à vis de l'enzyme. **kcat** est la vitesse d'hydrolyse du substrat.*

De ce schéma est dérivé l'équation 3. Dans notre cas, le facteur $\beta = 0$, il n'y a pas de formation de produit à partir du complexe ESI et le facteur $\alpha = 1$ car le profil d'inhibition est non-compétitif.

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{Ks + [S]} \cdot \frac{Ki}{Ki + [I]} \qquad (3)$$

avec v_i, la vitesse initiale (DO/min) ; V_{max}, la vitesse maximale (DO/min à t_0) ; [S], la concentration initiale en substrat (ATC, µM) ; [I], la concentration en inhibiteur (ligand n°22, µM) ; Ks, la constante de dissociation du substrat et Ki, la constante d'inhibition du ligand n°22 pour l'hAChE native.

Dans le cas des cholinestérases, cela signifie que le ligand n°22 possède la même affinité que l'enzyme soit libre ou acylée, ce qui est typique des ligands de la famille de la tacrine (Berman and Leonard 1992).

La régression non linéaire à l'aide de l'équation 3 indique une valeur de **Ki = 166.6 ± 3.6 µM** pour le ligand n°22. Cette valeur est 75 fois supérieure à celle estimée par docking moléculaire pour l'hAChE vieillie. L'hAChE vieillie étant inactive, il n'est pas possible de déterminer l'affinité de ce ligand à l'aide des méthodes cinétiques classiques. D'autres méthodes doivent être développées. Cependant, il a été établi que le 2-PAM et le HI-6 possèdent une meilleure affinité pour l'hAChE vieillie (respectivement, 8.7 µM et 7.9 µM) que pour l'hAChE native (respectivement, 150 µM et 38 µM) (Radic, Kalisiak *et al.* 2010). On constate que le

ligand n°22 a une affinité du même ordre de grandeur que ces deux oximes pour l'hAChE native.

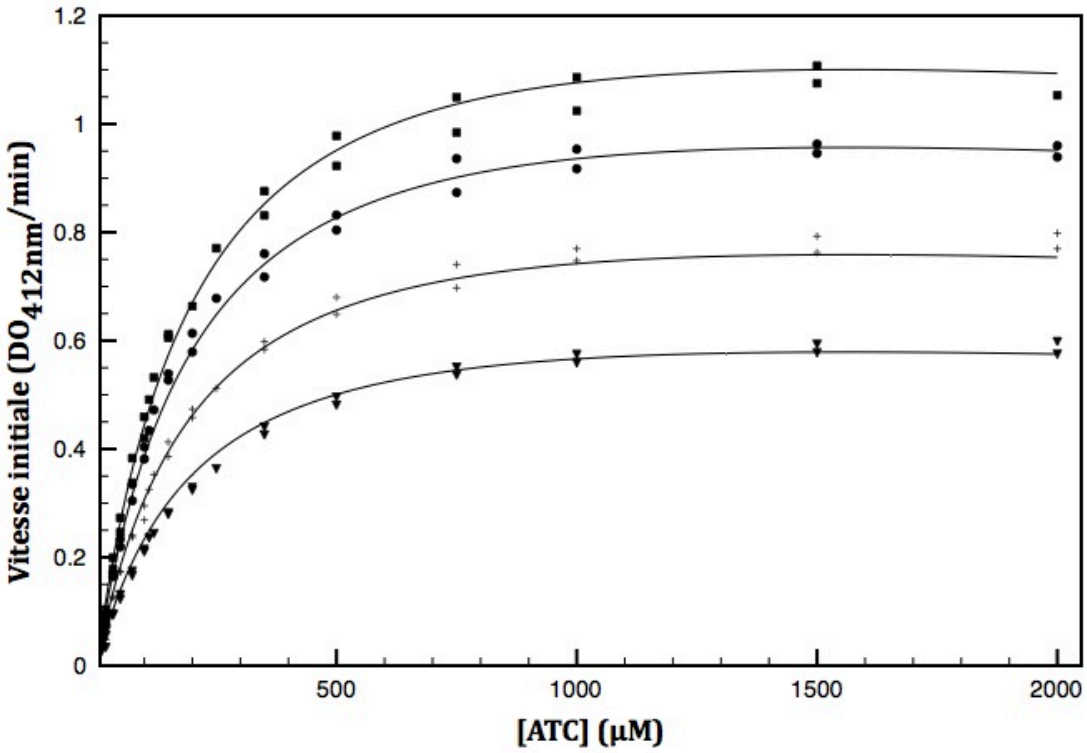


Figure 85 : Vitesse initiale de l'hAChE inhibée par 0 µM (■), 25 µM (●), 75 µM (+) and 150 µM (▼) de ligand n°22 en fonction de la concentration en substrat. (les points correspondent aux données de deux expériences indépendantes et les courbes résultent de l'ajustement simultané des paramètres cinétiques Vmax, Ks et Ki de l'équation 3 et pour les 4 concentrations de ligand).

Des essais préliminaires quant à la mise au point d'une méthode d'évaluation de l'affinité de ligands pour l'hAChE vieillie ont été effectués à l'aide d'une technique basée sur l'augmentation de la température de dénaturation d'une protéine réceptrice en présence d'un ligand, en anglais « fluorescence-based thermal shift assay » .

2-1-2. Ligand n°01 : 4-amino-7-chloroquinoline-2-carbaldéhyde oxime

2-1-2-1. Caractérisation du ligand n°01 par mesure du pKa

Il est important de déterminer le pKa du ligand n°01 pour connaître l'état de protonation de la fonction oxime à pH physiologique (7.4), sachant que celle-ci est active sous forme déprotonée, l'anion oximate.

Les oximes protonées absorbent à environ 340 nm (Odzak, Calic *et al.* 2007). Il est donc possible de suivre l'état de déprotonation de l'oxime en spectrophométrie UV en faisant varier le pH du tampon. Les spectres d'absorption du ligand n°01 ont été enregistrés sur une gamme de pH de 4.5 à 9.5 (figure 86-A).

Deux longueurs d'onde ont été choisies suivant l'amplitude de la variation de l'absorbance, l'une représentative de l'oximate (294 nm), avec une baisse de l'absorbance accompagnant la baisse de pH, l'autre de l'oxime (351 nm), avec une augmentation de l'absorbance accompagnant la baisse de pH. Les équations décrivant ces variations d'absorbance sont facilement dérivables à partir de la constante d'acidité Ka et la loi de conservation pour l'oxime :

$$Ka = \frac{[Ox^-][H^+]}{[OxH]} \quad \text{et} \quad [Ox]_0 = [Ox^-] + [OxH]$$

Après quelques réarrangements, on obtient les équations donnant la proportion d'oxime et d'oximate en fonction du pH :

$$[Ox^-] = \frac{[Ox]_0}{10^{(pKa-pH)} + 1} \quad (4a)$$

$$[OxH] = \frac{[Ox]_0}{10^{(pH-pKa)} + 1} \quad (4b)$$

De ces équations (4a) et (4b) peuvent être dérivées celles décrivant la variation d'absorbance en fonction du pH :

$$Abs(Ox^-) = \frac{\Delta Abs}{10^{(pKa-pH)} + 1} + Abs_0 \quad (5a) \quad \text{et}$$

$$Abs(OxH) = \frac{\Delta Abs}{10^{(pKa-pH)} + 1} + Abs_0 \quad (5b$$

L'absorbance à chaque longueur d'onde caractéristique est représentée en fonction du pH (figure 86-B) et le pKa est déterminé par régression non linéaire simultanée des deux courbes à l'aide des équations (5a) et (5b). Le pKa du ligand n°1 est **7.03 ± 0.11**. Ainsi, à pH physiologique qui est également le pH de travail pour toutes les expériences de cinétiques, le ligand n°01 existe majoritairement sous forme déprotonée, active.

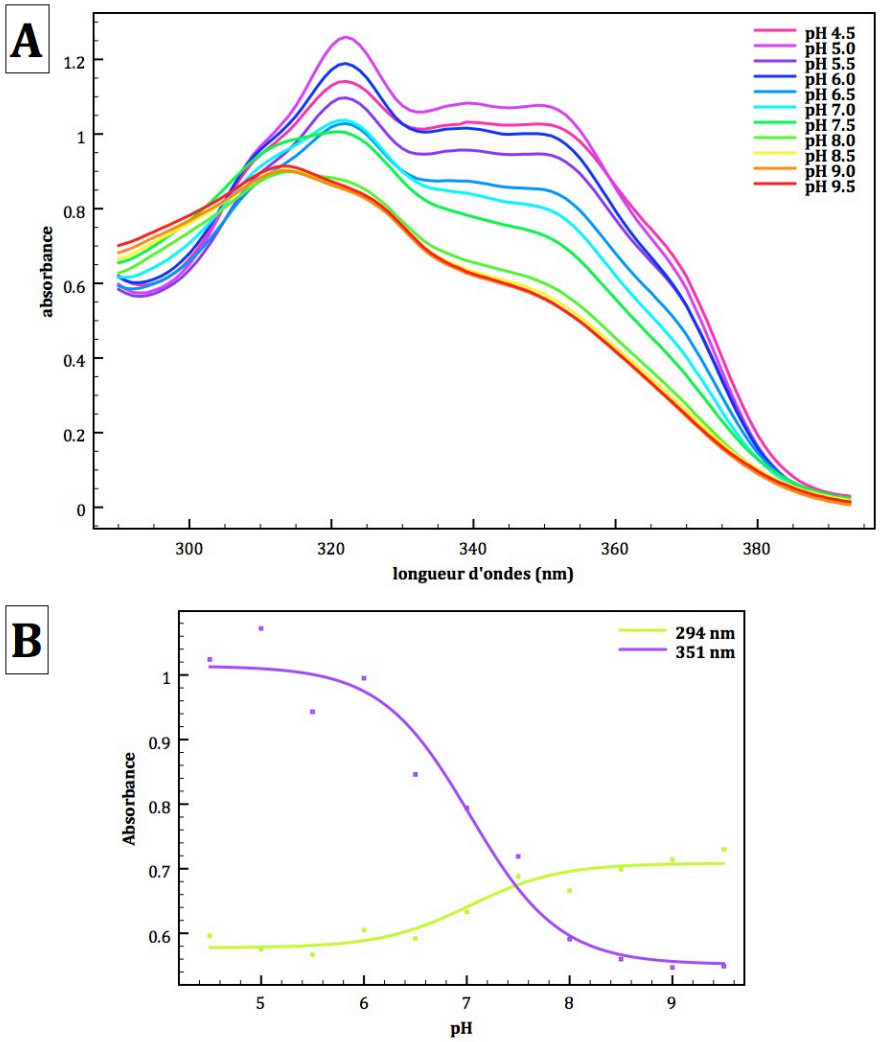


Figure 86 : Spectres d'absorption du ligand n°01 à différents pH (A) et représentation de l'absorbance du ligand n°01 en fonction du pH, à 294 nm pour la forme déprotonée et à 351 nm pour la forme protonée (B).

2-1-2-2. Mesure de la Constante d'Inhibition (Ki)

Comme pour le ligand n°22, les courbes d'inhibition du ligand n°01 indiquent qu'il s'agit d'un inhibiteur non-compétitif et la détermination de Ki est réalisée en utilisant l'équation 3 (figure 87). La constante d'inhibition du ligand n°01 vis à vis de l'hAChE native est du même ordre de grandeur que celle du ligand n°22, du 2-PAM et du HI-6, à **36.0 ± 1.0 µM**. (150 µM pour le 2-PAM et 38 µM pour le HI-6) (Calic, Vrdoljak *et al.* 2006) (Radic, Kalisiak *et al.* 2010).

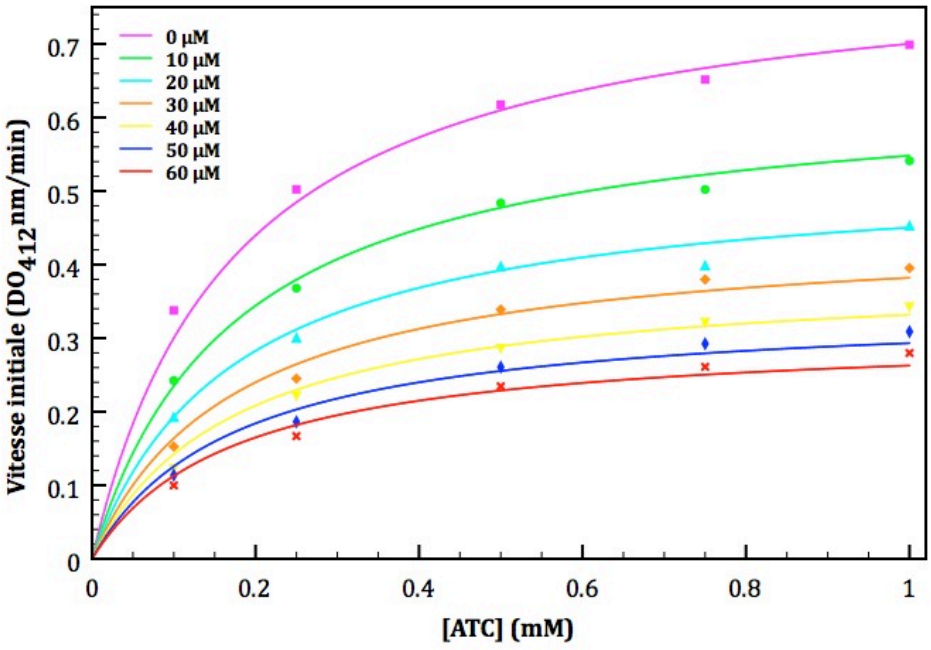


Figure 87 : Vitesse initiale de l'hAChE inhibée par 0 µM (■), 10 µM (●), 20 µM (▲), 30 µM (◆), 40 µM (▼), 50 µM (▮) et 60 µM (✕) de ligand n°01 en fonction de la concentration en substrat (ATC) (les points correspondent aux données expérimentales et la ligne continue à l'ajustement des paramètres cinétiques au modèle défini par l'équation 3).

2-2. Les ligands basés sur le noyau pyridinium

2-2-1. Caractérisation de l'affinité

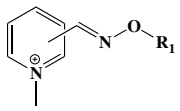
L'affinité pour l'hAChE native a été testée pour tous les composés synthétisés, ligands alkylants simples et réactivateurs bifonctionnels, regroupés dans le tableau 88, A et B. Les valeurs d'IC_{50} y sont associées quand elles ont pu être déterminées ainsi que les valeurs de Ki. Les IC_{50} pour les ligands synthétisés basés sur le noyau pyridinium ont été mesurées en suivant la même méthode que celle utilisée pour le ligand n°22.

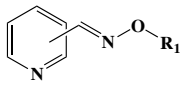
Suivant les profils des courbes expérimentales, les constantes d'inhibition (Ki) ont été déterminées à partir du modèle d'inhibition non-compétitive décrit ci-dessus (équation 3), ou d'un modèle d'inhibition compétitive décrit par l'équation 6.

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + \left(Ks \cdot \left(1 + \frac{[I]}{Ki} \right) \right)} \qquad (6)$$

avec v_i, la vitesse initiale (DO/min) ; V_{max}, la vitesse maximale (DO/min à t_0) ; [S], la concentration en substrat (ATC, µM) ; [I], la concentration en inhibiteur (ligand, µM) ; Ks, la constante de dissociation du substrat pour l'hAChE; Ki, la constante d'inhibition du ligand pour l'hAChE native.

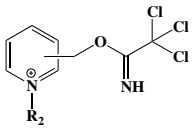
A

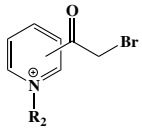




groupement R_1	Position de la fonction réactive sur un le noyau ***pyridinium***				Position de la fonction réactive sur le noyau ***pyridine***			
	ortho		*para*		*ortho*		*para*	
	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki
methyl	**1969** ± 168	***n.d***	**1016** ± 46	***n.d***				
ethyl	**1067**± 65	***n.d***	**861** ± 68	***n.d***				
iso-butyl	**1498** ± 102	***n.d***	**1421** ± 105	***n.d***				
benzyl	**232** ± 19	**62.0** ± 6.1	**460** ± 55	**123.7** ± 9.9	**> 1000**	***n.d***	**> 1000**	***n.d***
4-methoxybenzyl	**80.7** ± 7.2	**20.4** ± 1.6	**136** ± 12	**37.9** ± 2.0	**> 500**	***n.d***	**> 500**	***n.d***
2,4-dimethoxybenzyl	**66.1** ± 5.4	**9.0** ± 0.9	**80.9** ± 6.2	**12.4** ± 0.8				
2,3,4,5,6-fluorobenzyl	**191** ± 15	**22.1** ± 2.2	**45.9** ± 2.6	**13.3** ± 1.1	**> 200**	***n.d***	**> 600**	***n.d***
4-nitrobenzyl	**40.0** ± 1.5	**7.8** ± 0.8	**59.6** ± 4.6	**7.7** ± 0.6	**> 2000**	***n.d***		

B





groupement R_2	Position de la fonction réactive sur le noyau pyridinium/pyridine							
	ortho		*para*		*meta*		*para*	
	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki	IC_{50}	Ki
H					***délai***	***n.d***		
methyl	**291** ± 35	**414** ± 17	**948** ± 88	**136** ± 11	***délai***	***n.d***	***délai***	***n.d***
benzyl	**105.9** ± 9.4	**110.4** ± 3.5	**21.7** ± 1.9	**16.4** ± 0.6	**153** ± 18	***délai***	***non soluble***	***n.d***

Tableau 88 : Valeurs des IC_{50} et des constantes d'inhibition Ki (en µM) des ligands basés sur le noyau pyridinium vis à vis de l'hAChE native (A : les réactivateurs bifonctionnels ; B : les agents alkylkants) (n.d : non déterminé).

De manière générale, les ligands dont le noyau pyridine n'est pas quaternarisé sont peu ou pas solubles en tampon aqueux. De ce fait, la détermination précise de l'IC_{50} pour ces molécules n'a pas été possible. Pour chacun de ces ligands, le pourcentage d'activité cholinestérasique résiduelle mesurée est supérieure à 50 % lorsque la concentration limite de solubilité est atteinte. Ainsi, seule une limite supérieure quant à la valeur d'IC_{50} est incluse au tableau 88. Pour ces ligands, la constante d'inhibition n'a pas été mesurée.

En ce qui concerne les ligands à base de noyau pyridinium, il est possible de comparer l'affinité de ces molécules selon la position du substituant sur le cycle (ortho, meta et para), selon l'effet de la présence d'un ou de deux cycles aromatiques au sein de la molécule et, pour les réactivateurs bifonctionnels, l'effet de la nature du groupement alkylant.

De manière globale, l'affinité des réactivateurs bifonctionnels est meilleure que celle des ligands alkylants pour le site actif de l'hAChE native. De plus, les réactivateurs bifonctionnels sont des inhibiteurs non-compétitifs de l'hAChE alors que les ligands alkylants sont des inhibiteurs compétitifs.

D'après nos résultats, que ce soit pour les réactivateurs bifonctionnels ou les ligands alkylants, la **présence d'un deuxième cycle** favorise la liaison au site actif, ce qui s'explique par la nature aromatique des résidus tapissant la gorge.
Pour les réactivateurs bifonctionnels (partie A du tableau 88), les constantes d'affinité n'ont pas été déterminées pour les ligands ne possédant qu'un seul cycle aromatique, leur valeur d'IC_{50} étant largement supérieure à la limite acceptable pour ce type de ligand. En effet, une valeur d'IC_{50} de l'ordre du mM semble trop importante pour l'usage spécifique souhaité.
Pour les ligands alkylants (partie B du tableau 88) dont l'IC_{50} a pu être mesurée, le même constat est fait avec les mêmes amplitudes de variation des valeurs d'IC_{50}. Pour certains ligands, nous avons observé une phase de latence au cours de la mesure de l'activité cholinestérasique : l'activité est d'abord faible puis augmente au fil du temps. Une hypothèse est que le ligand s'hydrolyse spontanément en tampon aqueux perdant son pouvoir inhibiteur. Pour ces ligands, la valeur d'IC_{50} a été remplacé par l'annotation « délai ». Enfin l'un des dérivés benzyles était insoluble même en DMSO 100 %, la mesure n'a pu donc être effectuée.
La constante d'inhibition Ki a été déterminée pour les ligands alkylants portant la fonction trichloroacétamidate et pour les réactivateurs bifonctionnels portant deux cycles aromatiques.
Pour les premiers, l'affinité est entre 4 et 8 fois meilleure lorsque le groupement R2 est un cycle benzyle. Cela confirme le bénéfice de deux cycles aromatiques, pour augmenter les interactions avec le site actif de l'hAChE native.

Pour les seconds, il est possible de comparer cette affinité en fonction de la nature des substituants portés par le cycle benzénique masquant l'oxime. L'hypothèse est que **l'effet électroattracteur de ces substituants appauvri le cycle aromatique** en électrons et **renforce les interactions avec des résidus aromatiques du site actif**.

Quant au choix de la position ortho, meta ou para du bras fonctionnel sur le cycle pyridinium, une légère augmentation de l'inhibition est remarquable concernant les réactivateurs bifonctionnels, lorsque le substituant est en position ortho. Cela est d'autant plus vrai quand l'effet électroattracteur inductif de ce substituant diminue. Pour les substituants à fort pouvoir attracteur, on observe une inversion de cette tendance puisque les ligands portant le groupement 2,3,4,5,6-fluorogenzène n°115 (ortho) et n°116 (para) possèdent le même Ki vis à vis de l'hAChE native et le ligand n°113 (4-nitrobenzène en ortho) possèdent un Ki 1.7 fois supérieur à celui du ligand n°114 (4-nitrobenzène en para).

C'est pour les ligands alkylants portant la fonction trichloroacétamidate que la position du substituant a le plus d'importance puisqu'en position para, l'inhibition apparaît comme 3 à 7 fois plus importante qu'en position ortho.

2-2-2. Conclusions

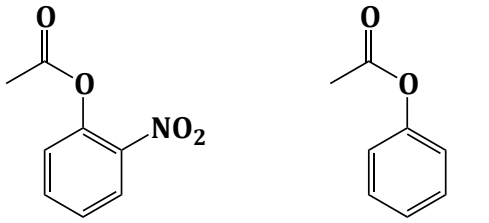
Ainsi, d'une manière générale, les ligands synthétisés basés sur le noyau pyridinium benzylés apparaissent intéressants en raison de la bonne affinité donnée par les deux cycles aromatiques. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions obtenues à partir des expériences en docking moléculaire qui annonçaient une meilleure affinité des ligands à un seul cycle, ce qui suggère que notre modèle de récepteur n'est pas adapté pour cette famille de ligands.

Les résultats d'affinité obtenus pour les réactivateurs bifonctionnels ne mettent pas en évidence de position et de nature préférentielles pour la fonction oxime masquée, les valeurs de Ki étant toutes de l'ordre de la dizaine de µM. Néanmoins, les interactions semblent être meilleures entre le site actif et le ligand si ce dernier possède un effet électroattracteur inductif élevé. Cette tendance a également été mise en évidence lors des expériences de docking moléculaire.

En ce qui concerne les agents alkylants, l'affinité augmente avec la présence de deux cycles aromatiques et avec le positionnement en para de la fonction

trichloroacétamidate. Nous verrons que lors de l'étude des complexes en cristallographie, une structure de cholinestérase a pu être résolue en complexe avec le ligand n°318, qui possède la meilleure affinité pour l'hAChE dans cette étude (Ki = 16.4 µM).

Comme décrit précédemment, les ligands alkylants portant une fonction bromoacétyle n'ont pu être analysés en utilisant la méthode d'Ellman. En effet, ces ligands interfèrent avec cette méthode qui nous le rappelons est basée sur la mesure de thiols libérés lors d'hydrolyse de thioesters de choline. Nous pouvons nous tourner vers d'autres substrats, comme le phénylacétate et l'*o*-nitrophénolacétate (figure 89), dont l'hydrolyse peut être suivie en spectrophotométrie. Malheureusement, il semble que ces substrats de nature aromatique ont tendance à interagir par stacking aromatique avec les ligands à tester. L'utilisation de ces substrats n'est donc pas non plus envisageable. A l'heure actuelle, nous n'avons pas trouvé de solution pratique permettant de caractériser l'affinité des ligands portant une fonction bromoacétyle.



***o*-nitrophenolacetate** **phenylacetate**

Figure 89: Structure chimique de l'o-nitrophénolacétate et du phénylacétate, substrats des cholinestérases.

Après avoir caractérisé ces ligands par leur affinité, une évaluation de leur réactivité vis à vis de l'hAChE inhibée ou vieillie a été réalisée.

3. Evaluation de la réactivité des ligands synthétisés

3-1. Le ligand n°01, une nouvelle oxime ?

3-1-1. Réactivation de l'hAChE inhibée par le VX

La capacité de réactivation du ligand n°01, une oxime basée sur un noyau chloroquinoline, a été testée sur l'hAChE inhibée par le VX dans les mêmes

conditions que l'oxime de référence, le HI-6. Son efficacité pourra lui être comparée. La représentation graphique (figure 90) met en évidence le pourcentage d'activité résiduelle obtenu en fonction du temps d'incubation de l'hAChE inhibée par le VX et du ligand n°01, et ce pour une gamme de concentrations allant de 10 à 500 µM.

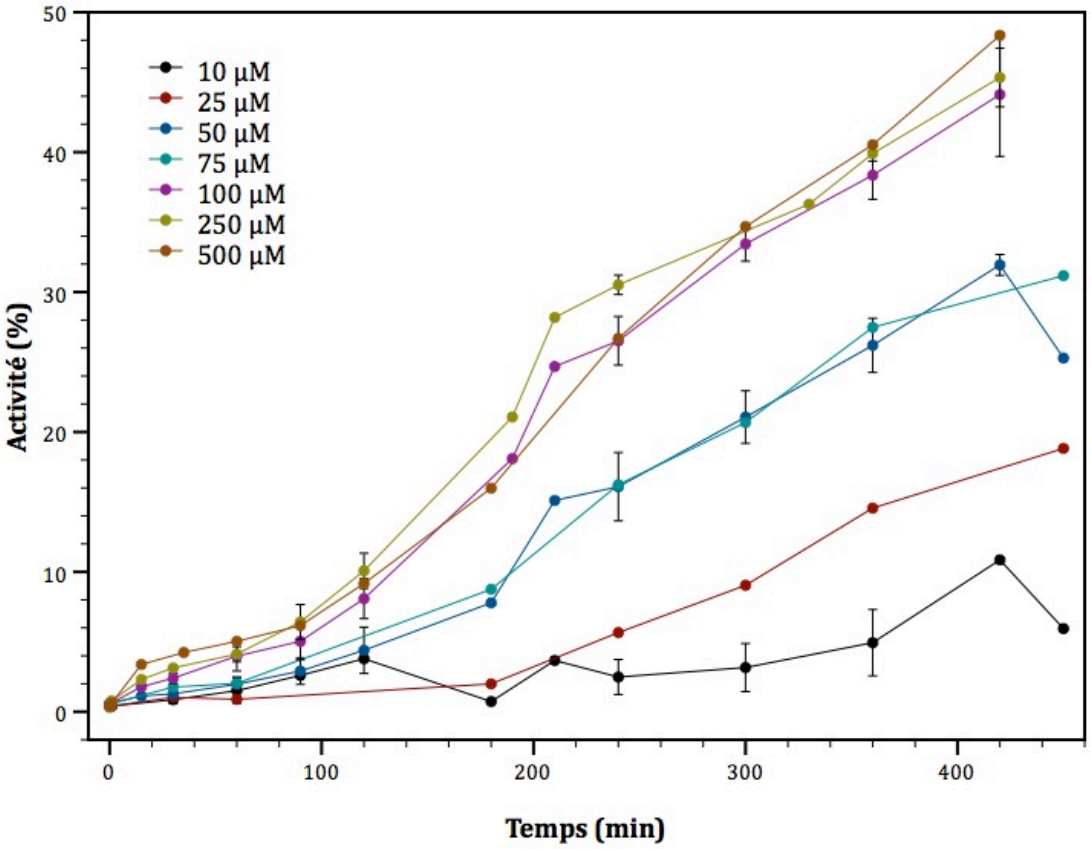


Figure 90: Activité cholinestérasique résiduelle de l'hAChE inhibée par le VX, en présence de 10 µM (●), 25 µM (●), 50 µM (●), 75 µM (●), 100µM (●), 250 µM (●) et 500 µM (●) de ligand n°01, en fonction du temps.

L'activité cholinestérasique résiduelle de l'hAChE inhibée par le VX augmente au cours du temps, de manière concentration dépendante. Néanmoins, on note une saturation de la vitesse de réactivation à partir d'une concentration en ligand de 100 µM. On atteint alors un taux de réactivation de **48 %** de l'activité initiale en **7 heures** (420 minutes).

Les courbes de réactivation sont clairement biphasique avec une transition vers 120 minutes. Une première phase de réactivation lente est observée suivi d'une deuxième phase plus rapide. Une préincubation du ligand ne change pas cet aspect biphasique de la réactivation, ce qui permet d'éliminer l'hypothèse d'une

conversion du ligand en une forme plus active. Une autre hypothèse serait celle d'une conversion lente du complexe VX-hAChE/ligand n°01 conduisant à un complexe plus facilement réactivable.

Nous avons caractérisé la deuxième phase de la réactivation, linéaire. La pente de la droite, correspondant au pourcentage de réactivation par minute, a été calculée pour chaque concentration et est représentée en fonction de la concentration en ligand n°01 (figure 91).

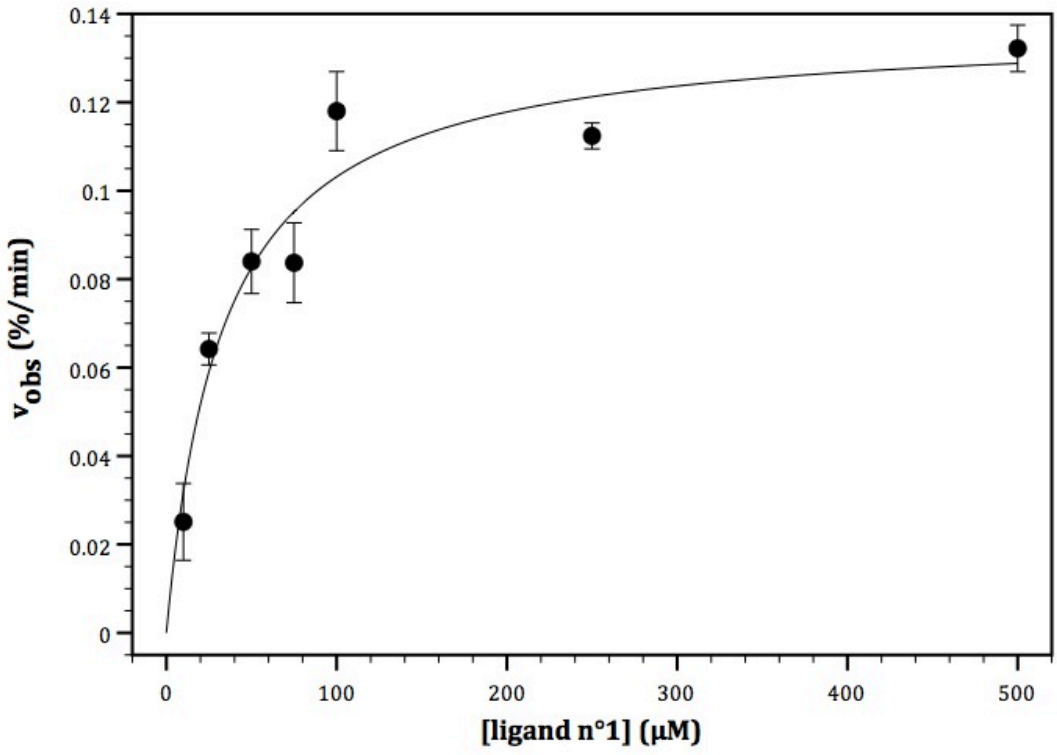


Figure 91: Vitesse de réactivation de l'hAChE inhibée au VX en fonction de la concentration en ligand n°01.

Nous observons une saturation de la vitesse de réactivation aux plus hautes concentrations qui s'explique par la formation d'un complexe réversible hAChE inhibée/réactivateur et la conversion de ce complexe en enzyme réactivée. Ce modèle classique de réactivation est décrit par l'équation 7:

$$v_{obs} = \frac{v_r \times [R]}{[R] + K_D} \quad (7)$$

avec v_{obs}, la vitesse observée de réactivation (%/min) ; v_r, la vitesse maximale de réactivation (%/min), [R], la concentration en ligand n°01 (µM) et K_D, la constante de dissociation du ligand pour l'hAChE inhibée par le VX (µM).

Un ajustement des paramètres de l'équation 7 à la courbe expérimentale donne K_D = **33.5 ± 10.0 µM** et v_r = **0.15 ± 0.01 %.min^{-1}**. La constante de réactivation k_r, soit le taux de réactivation du complexe par minute, est égale à vr/100, soit k_r = 0.0015 ± 0.0001 min^{-1}.

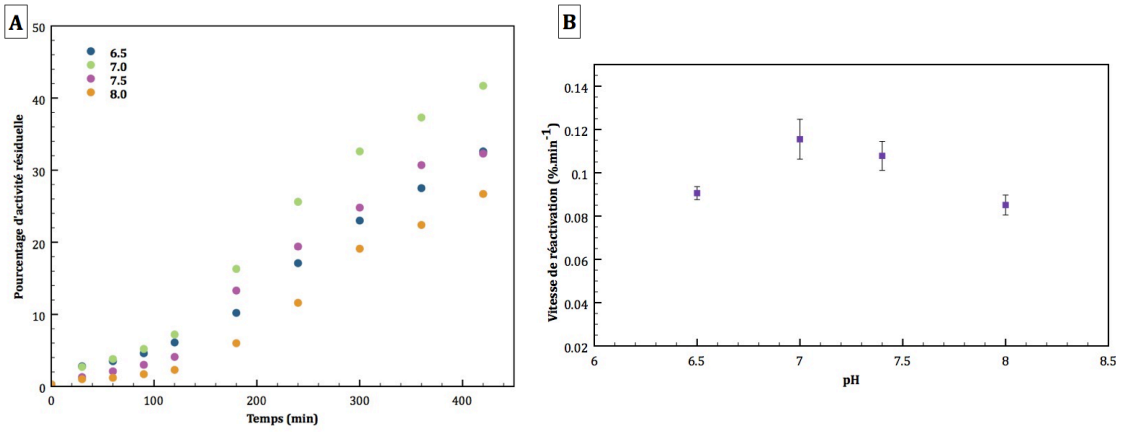
L'affinité du ligand n°01 pour le conjugué VX-hAChE est comparable à celle des oximes connues (entre 1.2 et 4.3 fois moins affine selon l'oxime : 28.1 µM pour le 2-PAM, 11.5 µM pour le HI-6, 7.8 µM pour le HLö-7 et 27.4 µM pour l'obidoxime). En ce qui concerne la constante de réactivation, elle est entre 150 et 600 fois plus lente que pour celle de ces mêmes oximes (0.22 min^{-1} pour le 2-PAM, 0.24 min^{-1} pour le HI-6, 0.49 min^{-1} pour le HLö-7 et 0.89 min^{-1} pour l'obidoxime) (Worek, Reiter *et al.* 2002). Quant a son efficacité, traduite par la constante bimoléculaire de réactivation, elle apparaît 200 fois inférieure à celle du HI-6, par exemple (k_{r2} = k_r/K_D = 0.045 mM^{-1}.min^{-1} pour le ligand n°01 contre 9 mM^{-1}.min^{-1} pour HI-6 (Mercey, Verdelet *et al.* 2011)). Néanmoins, le ligand n°01 reste intéressant compte tenu du fait que son squelette basé sur le noyau chloroquinoline non chargé est innovant. Le passage de la barrière hémato-encéphalique lui est possible et permet une action sur les cholinestérases inhibées au niveau du système nerveux central.

Cette vitesse de réactivation lente du ligand n°01 peut être due à une mauvaise orientation de la fonction réactive vis à vis du groupement phosphonyle, au manque de réactivité chimique ou une combinaison des deux. L'hypothèse d'un problème d'orientation du ligand dans le site actif pourrait être validée par la résolution d'une structure du complexe formé par le conjugué VX-hAChE et le ligand n°01 par cristallographie aux rayons X. La nature biphasique de la réactivation est également un aspect à étudier.

S'il est vrai qu'il existe des méthodes de modélisation capables de prédire l'affinité d'une molécule pour une autre, il est plus complexe de prédire la réactivité par modélisation moléculaire car il est alors nécessaire de calculer les énergies de rupture et de création de liaison au sein du site actif, ce qui nécessite de modéliser les molécules au niveau quantique, très coûteux en temps de calcul.

3-1-2. Effet du pH sur la réactivation

On souhaite comparer la vitesse de réactivation en fonction du pH. La réactivation de l'hAChE inhibée par le VX est réalisée selon le même protocole que précédemment, mais à une seule concentration en ligand n°01 (100 µM), concentration pour laquelle la vitesse de réactivation sature et à différents pH (6.5, 7.0, 7.4, 8.0). La figure 92-A montre également que la phase de latence de 120 minutes est présente à chacun des pH. La phase initiale lente est donc indépendante du pH. En revanche, la pente de la phase rapide varie légèrement selon le pH, avec à pH 7.0, une vitesse de réactivation la plus importante (0.12 %.min^{-1}), une vitesse de réactivation environ 25 % inférieure aux pH extrêmes, 6.5 et 8.0 (0.09 %.min^{-1}). A pH 7.4, cette diminution de la vitesse de réactivation est plus modérée (- 7 % avec 0.11 %.min^{-1}). La vitesse de réactivation de l'hAChE inhibée par le VX est la plus rapide lorsque le pH correspond au pKa du ligand n°01 (7.0)



<u>Figure 92</u> : Réactivation du conjugué VX-hAChE par 100 µM de ligand n°01 à pH 6.5 (●), 7.0 (●), 7.4 (●) and 8.0 (●) (A) et représentation de la vitesse de réactivation du ligand n°01 sur l'hAChE inhibée au VX en fonction du pH (B).

<u>3-2. Les réactivateurs bifonctionnels et agents alkylants</u>

3-2-1. Ligand n°22 : 7-chloro-4-hydroxyquinoline-2-carbaldéhyde O-méthyl oxime

Le ligand n°22 a été initialement conçu en tant que réactivateur bifonctionnel, portant une fonction oxime méthylée, dont le groupe méthyle serait transférable sur le phosphonate de l'hAChE vieillie. Bien qu'il était prévu dans le projet que la vérification d'une méthylation de la méthylphosphonylsérine se fasse par

spectrométrie de masse, nous avons tout de même réalisé un test rapide de réactivation de l'hAChE vieillie. Aucune réactivation n'est décelable dans les conditions habituelles de réactivation (pH 7.4 ; 37°C) à une concentration en ligand n°22 de 150 µM. Pour pallier une éventuelle alkylation qui ne serait pas suivie de la réactivation par l'oxime libérée, nous avons réalisé d'autres tests de réactivation en préincubant l'hAChE vieillie avec le ligand n°22, puis en ajoutant du HI-6, connu pour être une oxime relativement efficace pour les phosphonylsérines. Mais même en présence de HI-6, la réactivation n'est pas observée.

3-2-2. Les ligands basés sur le noyau pyridinium

Parmi tous les ligands basés sur le noyau pyridinium, aucun n'a permis la réactivation de l'hAChE vieillie par le soman, *in vitro*, en suivant le protocole consistant à ajouter du HI-6, après diverses périodes d'incubation. Malgré les expériences de docking moléculaire qui ont mis en évidence la possibilité de formation d'un complexe entre l'hAChE vieillie et ces ligands, il reste nécessaire de caractériser expérimentalement cette affinité afin d'identifier les conditions d'alkylation les plus propices. L'affinité pour l'enzyme vieillie sera déterminée par titration calorimétrique, ce qui n'a pas pu être réalisée durant cette thèse en raison de l'indisponibilité de l'appareil nécessaire (Calorimètre de Titration Isotherme).

4. Mise au point préliminaire d'une méthode de mesure d'affinité vis à vis de l'hAChE vieillie par thermofluorescence

L'affinité d'un ligand pour l'hAChE native n'est pas représentative de son affinité pour l'enzyme vieillie. Notre objectif est de mesurer l'affinité de ligands vis à vis de l'hAChE vieillie, qui est catalytiquement inactive, à l'aide de la méthode de « fluorescence-based thermal shift assay », appelée « thermofluorescence ».

4-1. Méthode de « fluorescence-based thermal shift assay »

La « thermofluorescence » utilise la dénaturation des protéines induite par une augmentation de la température. Cette méthode permet d'évaluer la stabilité d'une protéine (Mezzasalma, Kranz *et al.* 2007), d'identifier des conditions favorables à la stabilité d'une protéine, pour sa cristallisation par exemple (Ericsson, Hallberg *et al.* 2006) ou bien encore de caractériser des interactions entre la protéine et un

ligand (Matulis, Kranz *et al.* 2005) (Klinger, McComsey *et al.* 2006 ; Koblish, Zhao *et al.* 2006). La « thermofluorescence » a été initiée, au départ, pour permettre l'identification d'inhibiteurs de protéines-cible (Lo, Aulabaugh *et al.* 2004).

4-1-1. Principe

Une protéine, native, est mise en présence d'une sonde qui fluoresce sous certaines conditions. Dans notre cas, le colorant Sypro®Orange fluoresce lorsqu'il interagit avec les zones hydrophobes de la protéine. Cette sonde « s'éteint » en milieu aqueux. En augmentant la température du milieu, la protéine tend à se dénaturer progressivement, augmentant l'accessibilité de son cœur au solvant et donc de ses zones hydrophobes à la sonde. La fluorescence augmente proportionnellement à l'état de dénaturation de la protéine. En suivant la fluorescence, on suit donc l'état de dénaturation de la protéine. Plus la protéine est stable, plus sa dénaturation est lente, la température devant atteindre des valeurs plus élevées. La **température de fusion** (Tf) est un paramètre caractérisant la stabilité de la protéine vis à vis de la température. Elle représente la température à laquelle la protéine est présente à 50 % sous forme native et à 50 % sous forme dénaturée (figure 93).

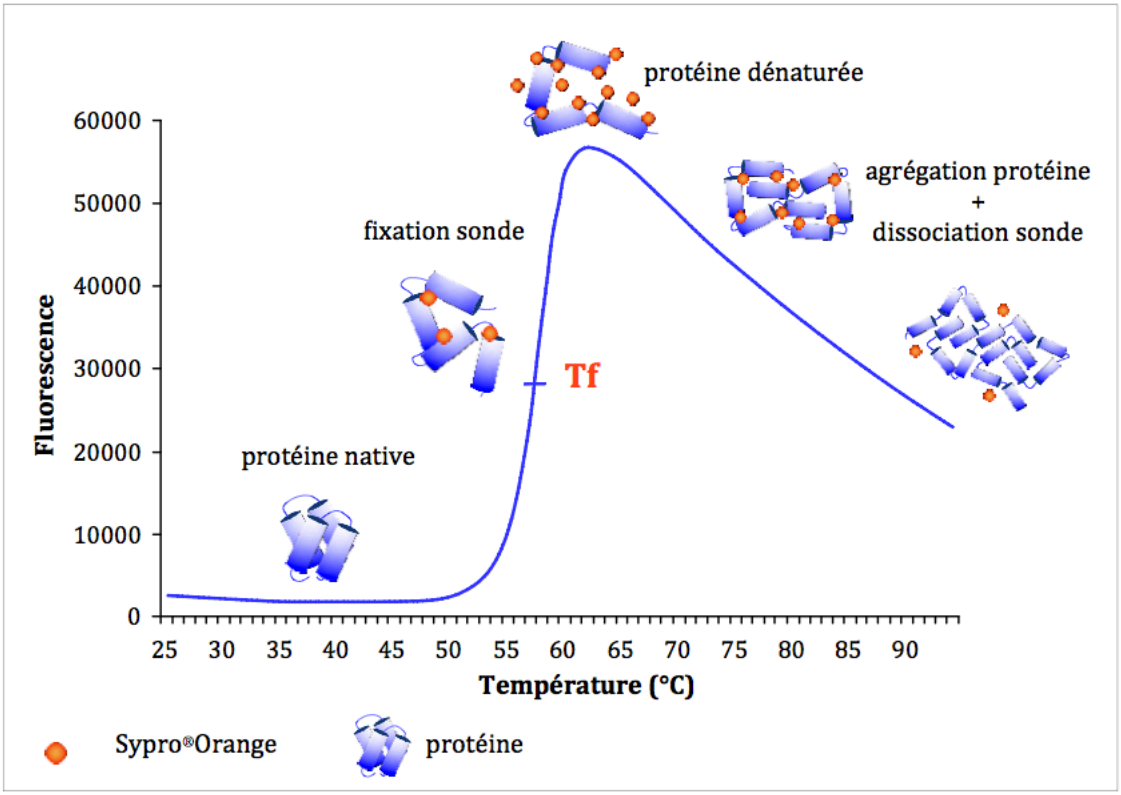


Figure 93 : Evolution de la fluorescence en fonction de la température au cours d'une expérience utilisant la méthode de « thermofluorescence »
(source : http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html)

A une certaine température, la fluorescence atteint son intensité maximale puis décline du fait de la dégradation de la protéine et donc de la libération de la sonde dans le milieu. En absence d'interaction, la sonde ne fluoresce plus.

4-1-2. Application aux interactions protéine-ligand

Lorsque qu'une protéine est mise en présence d'un ligand possédant une affinité pour elle, celui-ci tend à la stabiliser. Ainsi, la Tf de la protéine en complexe avec son ligand apparaît différente de la Tf de la protéine libre. On obtient une variation de la température de fusion, notée, **ΔTf**. En faisant varier la concentration en ligand, la stabilité de la protéine va être modifiée ainsi que la Tf du complexe protéine-ligand. On peut alors représenter graphiquement ΔTf en fonction de la concentration en ligand, et retrouver une courbe classique de saturation, et en déduire la constante de dissociation du ligand pour la protéine.

4-2. Méthodologie

Notre étude a été réalisée à l'aide du kit « Sypro®Orange Protein Quantification Kit » commercialisé par Invitrogen. Le colorant Sypro®Orange est excité à une longueur d'onde de 470 nm et émet à 530 nm. Les mesures sont réalisées sur un appareil LightCycler® 1.0 et 1.5 (Roche), initialement employé pour la PCR en temps réel. Le système contient un dispositif chauffage/refroidissement précis permettant des variations rapides de température ainsi qu'un dispositif de lecture simultanée de fluorescence de tous les échantillons présents dans l'appareil. Les échantillons sont préparés dans des capillaires, dans un volume final de 20 µl, ce qui minimise la consommation en réactifs et en protéine.

La plage de température utilisée est étalée au maximum de 30 à 75°C, avec une augmentation par incrément de 1°C chaque minute et une mesure de fluorescence à la fin de chaque augmentation de température.

L'avantage de ce kit est sa facilité d'utilisation. Le milieu réactionnel est mélangé volume à volume avec le colorant préalablement dilué, ce qui limite les erreurs sur les quantités mises en jeu.

La valeur de Tf est obtenue à partir de la dérivée de la fluorescence en fonction de la température. Le sommet de la courbe de la dérivée correspond à la Tf. Tf peut être déterminée graphiquement ou par adjustement des paramètres de l'équation empirique (8) à la courbe expérimentale.

$$\frac{dF}{dT} = (A \cdot T + B) + \left(\frac{C}{1 + e^{D(T - To)}} \right) + \left(E \cdot n \cdot Tf^{-n} \cdot T^{n-1} \cdot e^{-\left(\frac{T}{Tf}\right)^n} \right) \qquad (8)$$

avec F, la fluorescence ; T, la température (°C) ; T_0, la température initiale (°C) ; Tf, la température de fusion (°C) et n, A, B, C, D, et E, des paramètres empiriques.

4-3. Résultats

4-3-1. L'hAChE native

Tout d'abord, les conditions du milieu réactionnel ont été optimisées, notamment la nature du tampon, sa concentration et son pH.

Les trois conditions tampons testées sont les suivantes :

- condition 1 : tampon HEPES 20 mM, pH 7.5
- condition 2 : tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7.4
- condition 3 : tampon acétate d'ammonium 25 mM, pH 7.4

auquel est systématiquement ajouté 150 mM de NaCl, pour limiter les interactions non spécifiques entre ligands de protéine.

Deux séries ont été réalisées pour comparer les conditions 1 et 2 (figure 94-A) et une série a été réalisée pour comparer les conditions 2 et 3 (figure 94-B). L'ensemble des mesures correspondantes à une même condition tampon-pH a été traité simultanément à l'aide d'un logiciel permettant l'ajustement d'un paramètre partagé par plusieurs courbes à l'équation (8) décrivant l'allure générale de ces courbes. Cette méthode permet d'utiliser simultanément plusieurs séries de mesure pour calculer le paramètre Tf commun à toutes les mesures.

L'amplitude de fluorescence peut varier d'une série à une autre en raison de la différence de sensibilité des appareils utilisés. Néanmoins, l'amplitude du signal n'a pas d'impact sur la valeur de Tf.

Le tableau ci-dessous regroupe les valeurs de Tf et l'erreur associée, obtenues pour les différentes conditions tampon-pH testées. De très faibles variations pour la Tf de l'hAChE native sont observées. On peut considérer que les conditions que nous avons testées n'influent pas sur la stabilité de l'hAChE native.

Conditions	Tf (°C)	
tampon HEPES 20 mM, pH 7.5	54.3 ± 0.0	
tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7.4	55.1 ± 0.1	55.0 ± 0.0
tampon acétate d'ammonium 25 mM, pH 7.4		55.0 ± 0.1

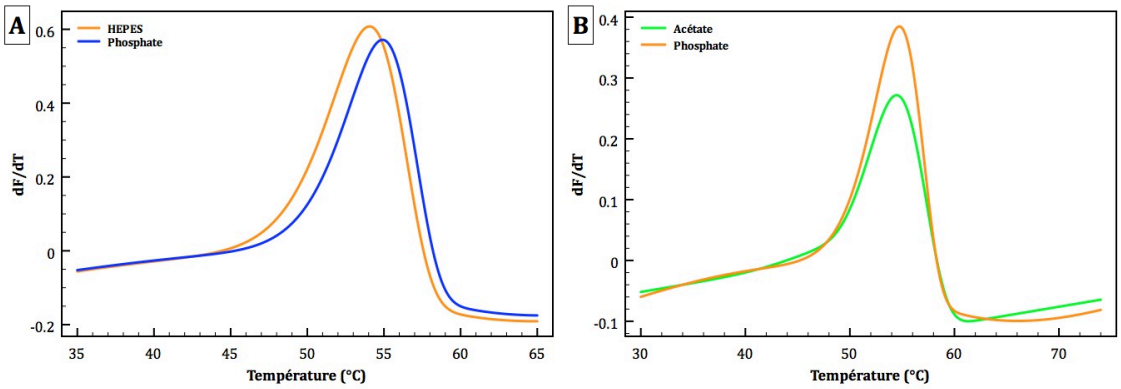


Figure 94 : Exemples de séries de données représentant la régression non-linéaire dF/dT en fonction de la température (°C), réalisées dans différentes conditions de tampon ((A) 50 mM de phosphate de sodium, pH 7.4 vs 20 mM HEPES, pH 7.5 ; (B) 50 mM de phosphate de sodium, pH 7.4 vs 25 mM acétate d'ammonium, pH 7.4 ; l'abscisse au maximum du pic correspond à la température de fusion de l'hAChE native dans les conditions testées).

De ce fait et pour corréler les résultats entre les expérimentations cinétiques et de thermofluorescence, notre choix pour la suite se porte sur le tampon phosphate de sodium 50 mM-pH 7.4, auquel est ajouté 150 mM de NaCl, pour retrouver des conditions proches des conditions physiologiques.

4-3-2. Effet de l'huperzine A sur l'hAChE native

L'huperzine A est un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase, utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, un temps envisagé comme traitement symptomatique potentiel de la maladie d'Alzheimer. La résolution de la structure cristallographique de la *Tc*AChE en complexe avec l'huperzine A (code pdb : 1VOT) (Raves, Harel *et al.* 1997) montre que la molécule interagit avec les résidus du site actif, par stacking aromatique avec Trp84 et Phe330 (respectivement, Trp86 et Tyr337 dans l'hAChE), par liaison hydrogène avec Tyr130 (Tyr133 dans l'hAChE) et par interactions hydrophobes.

Les études cinétiques réalisées avec l'huperzine A montrent que cette molécule a une haute affinité pour l'acétylcholinestérase, sa constante d'affinité étant de l'ordre de la dizaine de nanomolaires (Ashani, Peggins *et al.* 1992) (Ashani, Grunwald *et al.* 1994). Il nous faudrait donc utiliser des concentrations de cet ordre pour mesurer l'affinité de l'huperzine A par thermofluorescence. Mais la méthode nécessite des concentrations d'enzyme de l'ordre du µM pour obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant. Comme il est nécessaire d'être au minimum dans des conditions stœchiométriques, les concentrations d'huperzine A sont donc toujours saturantes. Notre objectif ici est de montrer que l'effet stabilisant d'un ligand non-covalent est mesurable en thermofluorescence.

L'huperzine A est incubée en présence d'hAChE, en rapport stoechiométrique 1 : 1 à 10 µM, pendant 2h20 avant d'effectuer le début de la mesure. La figure 95 montre que la Tf du complexe est supérieure de **+ 3.5 °C** à celui de l'enzyme native (**54.6 ± 0.1°C** et **58.2 ± 0.2°C**, respectivement en absence et en présence d'huperzine A). Nous avons donc une effet mesurable. En revanche, si la constante d'affinité d'un ligand est inférieure (comme c'est le cas pour l'huperzine A) ou de l'ordre de la concentration en enzyme, elle ne pourra pas être précisément mesurée car il est nécessaire d'être en conditions saturantes en ligand. Nous ne pourrions que conclure que la constante est inférieure à la concentration en enzyme utilisée lors du test.

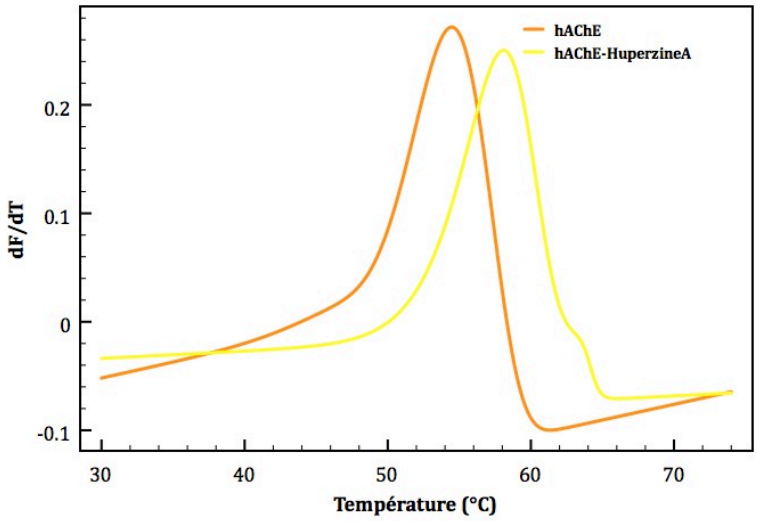


Figure 95 : Représentation graphique de la régression non-linéaire de dF/dT en fonction de la température (°C) de l'hAChE native (—) et de l'hAChE en complexe avec l'huperzine A (—).

4-3-3. L'hAChE vieillie par le soman

4-3-3-1. Contrôle de l 'effet de l'isopropanol

L'isopropanol (iPrOH) est le solvant dans lequel sont conservés les OPs à -20°C. De nombreuses études de cinétique réalisées au laboratoire ont montré un effet dénaturant de l'iPrOH sur l'hAChE sur des incubations de plusieurs dizaines de minutes et au delà de 5 % d'iPrOH lors de la mesure. Cela est aussi vrai pour le méthanol et l'éthanol, deux autres alcools employés comme solvant. Ainsi, il est nécessaire de connaître l'effet que l'iPrOH peut engendrer lors des mesures de thermofluorescence et de les minimiser au mieux.

Nos expériences de contrôle confirment que l'iPrOH, à un taux de 5%, a un effet déstabilisateur de l'hAChE. La valeur de Tf passe de **54.6 ± 0.1°C** pour l'hAChE sans iPrOH à **49.8 ± 0.1°C** pour l'hAChE en présence de 5 % d'iPrOH soit **ΔTf = -4.8°C** (figure 95). Il est possible de limiter cet effet déstabilisant de l'hAChE en ramenant le pourcentage final d'iPrOH, présent pendant la mesure, à 1.3 % (figure 95). En effet, la Tf dans ces conditions n'est que peu modifiée (Tf = **53.2 ± 0.06°C** soit **ΔTf = -1.4°C**).

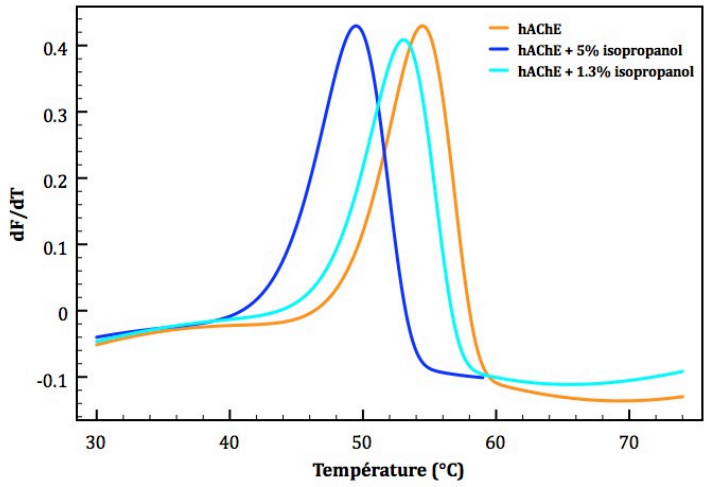


Figure 95 : Représentation graphique de la régression non-linéaire dF/dT en fonction de la température (°C) de l'hAChE native en absence d'iPrOH (—), en présence de 5% d'iPrOH (—) et de 1.3% d'iPrOH (—).

Les expérimentations suivante seront donc réalisées avec un pourcentage final d'iPrOH présent lors de la mesure à 1.3 %.

4-3-3-1. Effet du vieillissement par le soman

L'hAChE est incubée 30 minutes en tampon phosphate 50 mM-pH 7.4, en présence d'un excès de soman (50 µM) afin de permettre l'inhibition totale de l'enzyme ainsi que son vieillissement. L'excès de soman qui n'a pas réagi avec l'hAChE est rapidement hydrolysé dans le milieu réactionnel. Il est indéniable que la fixation du soman dans le site actif de l'hAChE entraine un effet stabilisateur puisque l'on obtient un **ΔTf = +11.6°C** entre les échantillons d'hAChE native (**54.5 ± 0.4°C**) et d'hAChE vieillie par le soman (**66.2 ± 0.3°C**) (figure 96). Si l'on tient compte de l'effet de l'iPrOH présent à hauteur de 1.3 %, dans les échantillons, ΔTf s'élève à **+10.2°C**, ce qui démontre l'effet stabilisateur de la méthylphosphonylsérine via les interactions avec le trou oxyanion, le pont salin avec l'imidazolium de l'histidine catalytique et la propension à stabiliser des ligands dans la poche « choline ». D'après ces résultats, on comprend clairement que le site de l'enzyme vieillie est significativement différent de celui de l'enzyme libre et qu'il est indispensable de mesurer l'affinité des ligands pour l'enzyme vieillie.

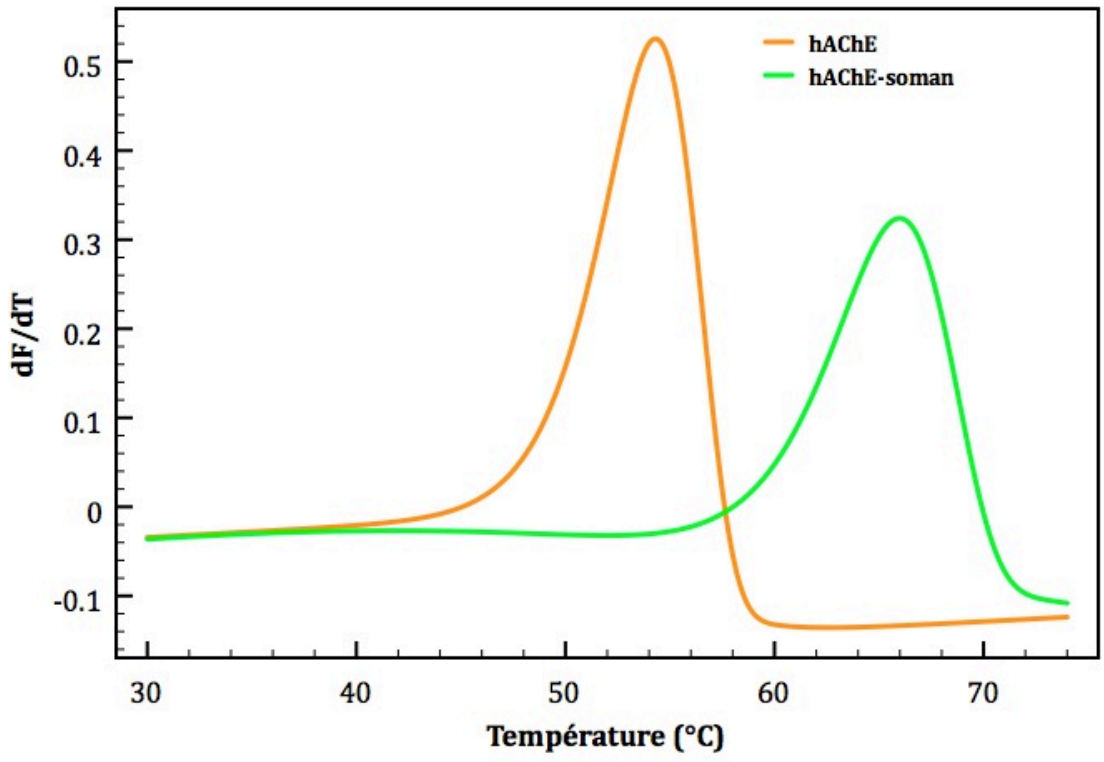


Figure 96: Représentation graphique de la régression non-linéaire dF/dT en fonction de la température (°C) de l'hAChE native (—) et de l'hAChE incubée 30 minutes avec un excès de soman (—).

4-3-4. Effet du 2-PAM et du HI-6 sur l'hAChE native et viellie

Le 2-PAM et le HI-6, en tant qu'oximes, sont des ligands non-covalents de l'hAChE avec, néanmoins, une affinité 1000 fois plus faible que l'huperzine A, de l'ordre de la dizaines de micromolaires.

hAChE	**Ø**	**2-PAM** (100 µM)		**HI-6** (100 µM)	
		Tf	**ΔTf**	Tf	**ΔTf**
- soman	53.8 ± 0.3	53.7 ± 0.3	**- 0.1**	53.8 ± 0.3	**+ 0.0**
+ soman	65.9 ± 0.1	66.0 ± 0.1	**+ 0.1**	65.9 ± 0.1	**+ 0.0**
ΔTf	**+ 12.1**	**+ 12.3**		**+ 12.1**	

Tableau 98 : Valeurs de Tf (°C) obtenus pour l'hAChE, vieillie ou non, en complexe avec différentes oximes à 100 µM (10 µM d'hAChE sont incubés 30 minutes en présence de 50 µM de soman puis la mesure débute 5 minutes après l'ajout de 100 µM d'oxime à tester).

Les variations de Tf (**ΔTf ~ + 12°C**) confirment l'effet stabilisateur du soman pour l'hAChE (tableau 98 et figure 100). En revanche, la présence de 2-PAM ou de HI-6 (stoechiométrie 1 : 10) n'apparaît pas comme stabilisant, que l'enzyme soit native ou vieillie. La constante d'affinité de ces oximes pour l'hAChE native est de l'ordre de 100 µM, valeur de la concentration testée. Nous sommes dans des conditions non saturantes avec un équilibre entre l'enzyme libre et le complexe enzyme-ligand. Nous avons alors testé une concentration saturante de 2-PAM de 1 mM, 10 fois supérieure au Ki. Malheureusement, nous n'avons pas observé d'avantage de déplacement très significatif de la Tf (tableau 99). A 1 mM, la présence de 2-PAM n'a pas d'effet stabilisateur significatif mesurable ni sur l'hAChE native, ni sur l'hAChE vieillie.

hAChE	- 2-PAM	+ 2-PAM (1mM)	**ΔTf**
- soman	54.0 ± 0.2	54.2 ± 0.2	**+ 0.2**
+ soman	65.9 ± 0.2	66.1 ± 0.7	**+ 0.2**
ΔTf	**+ 11.9**	**+ 11.9**	

Tableau 99 : Valeurs de Tf (°C) obtenus pour l'hAChE, vieillie ou non, en complexe avec 1 mM de 2-PAM (10 µM d'hAChE sont incubés 30 minutes en présence de 50 µM de soman puis la mesure débute 5 minutes après l'ajout du 2-PAM).

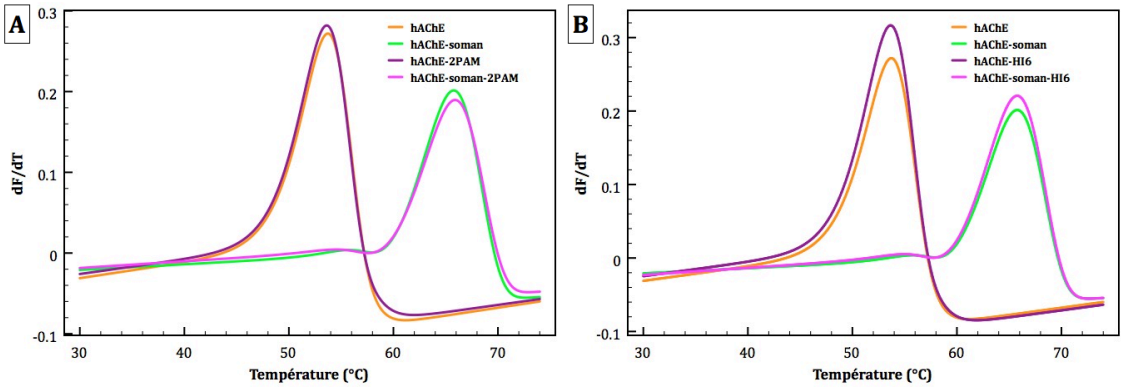


Figure 100 : Représentation graphique de la régression non-linéaire de dF/dT en fonction de la température (°C) de l'hAChE native (—) ou vieillie (—) en complexe avec 100 µM de 2-PAM (A) ou 100 µM de HI-6 (B) (— et —).

L'absence d'effet stabilisateur des oximes 2-PAM et HI-6 sur l'hAChE native et vieillie s'explique donc, soit par une affinité trop faible de ces oximes pour l'enzyme, soit par un manque de sensibilité de la méthode, soit les deux. Le ligand n°22 est tout de même testé par cette méthode bien que son affinité pour l'hAChE soit proche de celle de ces deux oximes.

4-3-5. Effet du ligand n°22 sur l'hAChE

Tout comme pour le 2-PAM et pour le HI-6, les observations faites vis à vis de la fixation du ligand n°22 dans l'hAChE native ou vieillie ne permettent pas de conclure à un effet stabilisateur ou déstabilisateur utilisable pour mesurer une constante d'affinité, puisque l'on n'observe pas de variation significative de la Tf (tableau 101), quelque soit la concentration en ligand n°22. La tendance irait plutôt vers une déstabilisation aux vues des valeurs négatives des ΔTf à la plus haute concentration choisie.

ΔTf (°C)	+ ligand n°22 (150µM)	+ ligand n°22 (600µM)
- soman	**- 1.2**	**-0.5**
+ soman	**-0.4**	**-0.4**

Tableau 101 : Valeurs de ΔTf *(°C) de l'hAChE, vieillie ou non, en complexe ou non avec 150 ou 600 µM de ligand n°22 (10 µM d'hAChE sont incubés 30 minutes en présence de 50 µM de soman puis la mesure débute 5 minutes après l'ajout du ligand n°22).*

4-4. Discussion

Les résultats obtenus ne permettent finalement pas d'exploiter cette méthode pour évaluer l'affinité des ligands vis à vis de l'hAChE vieillie comme cela était envisagé au début de cette mise au point.

Il est indiscutable que la technique de thermofluorescence est intéressante pour l'étude de l'effet de ligands covalents tels que les OPs voire pour les ligands non covalents avec une haute affinité. Néanmoins, il est possible que le cumul de plusieurs ligands dans un même site actif engendre des effets stabilisateurs non cumulatifs. De ce fait, un fort effet stabilisateur dû à la formation d'un conjugué avec un OP pourrait masquer l'effet d'un ligand non covalent. Ceci dit, à part l'huperzine A, les ligands que nous avons testés n'avaient pas plus d'effet sur l'enzyme native. Quoiqu'il en soit, la technique ne semble pas assez sensible pour permettre ce type d'étude.

De plus, la thermofluorescence est un outil dont les mesures sont indirectes. Il serait plus précis de pouvoir suivre la fixation du ligand en direct. Cela est envisageable avec la technique de **calorimétrie de titration isotherme** (ITC). Celle-ci permet la détermination de paramètres thermodynamiques lors d'interactions en solution, comme la fixation de petites molécules (ligands) sur des macromolécules (protéine, ADN). Il est alors possible de quantifier directement la constante d'association (Ka), les modifications d'enthalpie (ΔH) et la stœchiométrie de liaison lors de cette interaction, grâce à la relation :

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln\left(K_a\right) = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

avec G, l'énergie libre (de Gibbs) ; R, la constante des gaz parfait ; T, la température ; Ka, la constante d'association ; H, l'enthalpie et S, l'entropie.

Le calorimètre est constitué de deux cellules identiques, une de référence, contenant du tampon seul, et une d'expérimentation, contenant la macromolécule dans le tampon, chaque cellule étant entourée d'une enveloppe adiabatique (pas d'échange thermique avec le milieu extérieur). La température est contrôlée très rigoureusement. Ainsi, l'ajout d'un ligand dans la cellule d'expérimentation va engendrer une variation de la température, par rapport à la cellule de référence, selon que la réaction soit endothermique ou exothermique. Les mesures consistent à enregistrer la puissance de chauffe nécessaire pour maintenir une température

identique dans les deux cellules en fonction du temps. Cette puissance varie selon la nature du ligand et sa concentration. Ces mesures d'énergie donnent accès aux paramètres thermodynamiques et stœchiométriques de l'interaction entre le ligand et la macromolécule. Cette technique sera plus précise et mieux adaptée que la thermofluorescence. Cette technique permet également de réaliser des mesures des vitesses réactionnelles si celles-ci sont exo- ou endothermiques, ce qui nous permet, par exemple, de nous affranchir des problèmes d'interactions entre les ligands et substrats, comme c'est le cas pour les composés portant une fonction bromoacétyle dans le cadre des expériences de réactivation.

5. Conclusion

L'évaluation biologique des composés synthétisés, qu'ils soient agents alkylants simples ou réactivateurs bifonctionnels, n'a pas été aisée du fait de la nécessité de travailler avec l'hAChE vieillie inactive. Les techniques de mesure d'activité cholinestérasique à base de spectrophotométrie sont hors jeu. La thermofluorescence n'est pas assez sensible. La technique ITC apparaît comme l'alternative la plus prometteuse pour évaluer nos ligands sur l'hAChE mais également sur la BChE vieillie.

Nous avons cependant obtenus quelques résultats cinétiques intéressants avec le ligand n°01. Cette oxime a pu être évaluée dans son emploi en tant que réactivateur de l'hAChE inhibée, malgré une zone d'ombre sur l'allure biphasique de la réactivation. La caractérisation cinétique de la réactivation (affinité et efficacité) montre un intérêt relativement limité puisqu'il n'améliore pas la réactivation de l'hAChE inhibée par rapport aux oximes déjà connues. Néanmoins, la structure basée sur le noyau chloroquinoline innove par rapport aux oximes déjà existantes. Une hypothèse est que la faible réactivité est liée à une mauvaise orientation de la fonction oxime dans le site de l'hAChE. Nous envisageons de la tester dans la BChE dont la topologie du site actif et le mode de liaison des ligands sont fort différents. Ce type de molécules pourrait s'orienter de manière plus optimale dans la BChE que dans l'hAChE.

Nous poursuivons l'étude de nos ligands les plus affins par cristallographie afin de vérifier leur mode de fixation dans le site actif des cholinestérases.

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE

1. Généralités

La cristallographie aux rayons X est une technique qui permet de déterminer l'organisation tridimensionnelle des atomes de biomolécules telles que les protéines et les acides nucléiques, à une résolution de l'ordre de 1 Å. La connaissance de la structure des biomolécules permet de mieux comprendre leur fonctionnement, structure et fonction étant étroitement liées.

Historiquement, les premières résolutions de structures de protéines par cristallographie aux rayons X se situent dans les années 50. Perutz et Kendrew ont reçu le prix Nobel de Chimie en 1962 pour avoir résolu la structure de la myoglobine de cachalot (Kendrew, Bodo *et al.* 1958). Depuis, de nombreuses autres biomolécules ont vu leur structure définie et ce, majoritairement grâce à la cristallographie aux rayons X. D'après les données de la Protein Data Bank (PDB), 88 % des structures de protéines ont été résolues par cristallographie aux rayons X (le reste par résonnance magnétique nucléaire (RMN) (11 %), microscopie électronique, ….) (http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do). Aujourd'hui, la PDB contient plus de 76 000 structures de biomolécules dont 93 % de protéines. L'avantage de la cristallographie est qu'elle permet de travailler sur des molécules de haut poids moléculaires contrairement à la RMN, par exemple. Aujourd'hui, la cristallographie aux rayons X est un outil d'analyse « de routine » pour les scientifiques qui cherchent à comprendre les mécanismes d'interaction et de fonctionnement de molécules, notamment pharmaceutiques.

2. Principe

La technique de cristallographie aux rayons X est basée sur quatres étapes : l'obtention de cristaux de la biomolécule ou cristallogenèse ; la collecte d'images de diffraction des rayons X à partir de ces cristaux ; le traitement informatique des données de diffraction ; la construction du modèle atomique (figure 102).

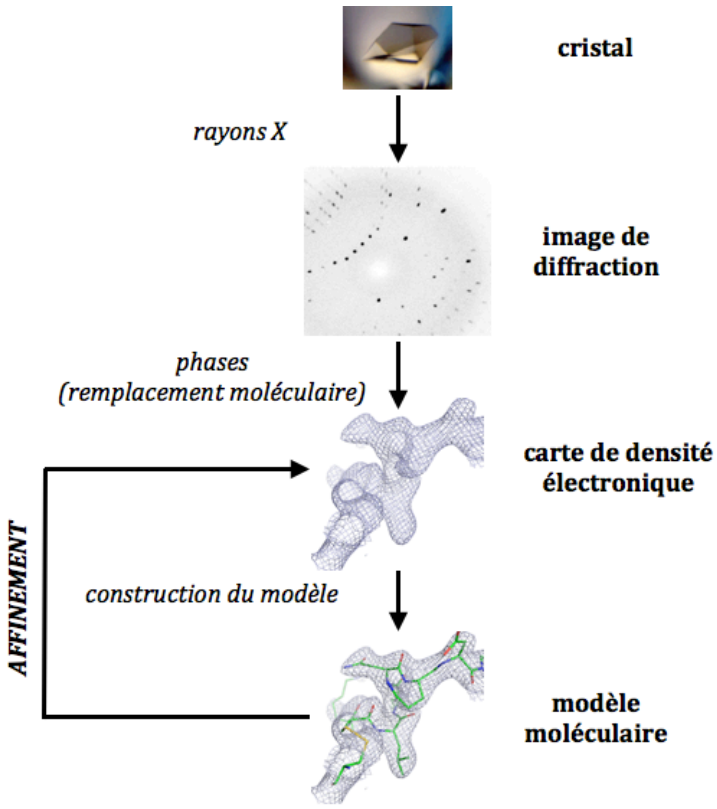


Figure 102 : Schéma des différentes étapes d'obtention d'une structure tridimensionnelle de protéine par cristallographie aux rayons X (source : own work ; http://science.nasa.gov/ssl/msad/pcg/ ; image de diffraction myoglobine ; les autres images sont issus de Pymol (www.pymol.org) à partir de la structure de BChE, code 1p0i)

2-1. La cristallogenèse

Si on souhaitait résoudre la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir d'une seule molécule en solution en l'exposant aux rayons X, la diffusion serait de trop faible intensité pour être mesurée, et une intensité trop importante du rayon incident conduirait à une dégradation instantanée de la molécule. De plus, la protéine n'aurait ni position, ni orientation définie. Un cristal est constitué d'un empilement tridimensionnel ordonné de la protéine (10^{15} molécules par cristal) et périodique (unité de base = maille). Chacune des molécules de protéine contribue au signal, l'intensité et la diffusion des rayons sont alors suffisantes et cohérentes. Il apparaît un phénomène de diffraction en raison d'une amplification du signal dans les directions d'interférences constructives et destructives. La dégradation de l'échantillon protéique est partagée entre toutes les molécules du cristal. La cohésion entre les molécules protéiques dans le cristal est assurée par des interactions non covalentes, de type Van der Waals, liaisons hydrogène, hydrophobes, électrostatiques. Les espaces entre les molécules sont comblés par le

solvant, généralement de l'eau, qui représente environ 50 % du volume du cristal. Cette caractéristique en fait une entité fragile. Ainsi, la protéine est dans un milieu aqueux et sa structure dans le cristal est proche de celle adoptée en solution.

L'obtention des cristaux est l'étape limitante de la cristallographie. En effet, une protéine cristallise dans des conditions très restreintes de nature et de concentration en agents précipitants et tampons, de pH, de température, de force ionique. Il faut faire varier ces différents paramètres afin d'identifier les conditions de sursaturation de la protéine, entre l'état soluble et l'état de précipité. Lorsque la sursaturation est suffisante, des cristaux peuvent commencer à croître à partir de germes (zone de nucléation). Mais le nombre de germes doit être limité sous peine d'obtenir une multitude de microcristaux. Toute la difficulté consiste à trouver des conditions où les germes se forment en nombre limité et où les conditions de croissance cristalline sont maintenues le plus longtemps possible pour obtenir des cristaux dont les dimensions sont de l'ordre de la dizaine/centaine de µm. Selon le diagramme de phases ci-dessous (figure 103) (Saridakis, Stewart *et al.* 1994) (Garcia-Ruiz, Otolora *et al.* 2001), la sursaturation évolue en fonction de la concentration en protéine et en agent précipitant (McPherson 1999 ; Dessau and Modis 2011)

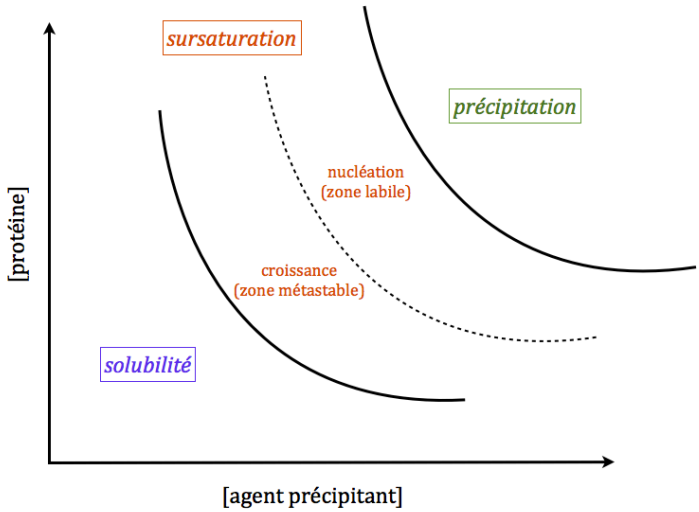


Figure 103 : Schéma du diagramme de phase au cours de la cristallogenèse (source : thèse de E. Carletti)

Parmi les trois méthodes de préparation des cristaux envisageables, les deux méthodes par diffusion de vapeur sont les plus répandues car simples à mettre en œuvre et nécessitant des faibles volumes de solutions. Dans une enceinte close, un

équilibre s'établit entre un **réservoir**, contenant du tampon et de l'agent précipitant, et une **goutte,** soit « **suspendue »** au dessus de ce réservoir (schéma 104), soit « **assise** » sur ce réservoir et contenant la protéine, le tampon et l'agent précipitant, ce dernier étant présent en concentration plus faible que dans le réservoir. Les composants volatiles, essentiellement l'eau, diffusent de la goutte vers le réservoir jusqu'à l'équilibre de la tension de vapeur. Ainsi, la protéine et l'agent précipitant voient leur concentration augmenter dans la goutte, tendant vers les conditions favorables à la cristallisation (McPherson 2004).

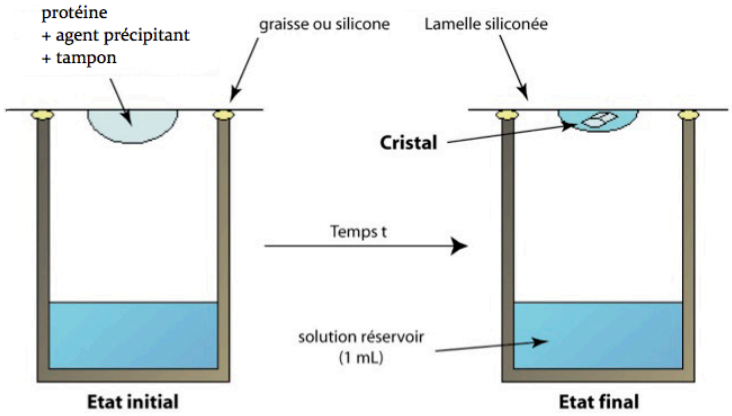


Figure 104 : Schéma de la méthode de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue (source : thèse de E. Carletti)

2-2. La diffraction aux rayons X

En premier lieu, le cristal à analyser est péché dans la goutte de croissance à l'aide d'un support en forme de boucle aux dimensions du cristal . Le cristal, monté sur la boucle, est alors trempé dans une solution contenant un agent cryoprotectant (le glycérol dans notre cas) pour éviter la formation de glace lors de sa congélation par trempage dans l'azote liquide. De la glace génère une diffraction intense qui noie la diffraction propre à la protéine. Cette étape de congélation est nécessaire car la collecte des images est réalisée à 100 K, sous un flux d'azote gazeux pour limiter un endommagement rapide du cristal.

En second lieu, le cristal monté est placé sur le trajet d'un faisceau de rayons X monochromatique. Ces rayons possèdent une longueur d'onde de l'ordre de grandeur de la distance inter-atomique, l'angström (Å) (1 Å = 10 nm).
Les atomes constitutifs d'un cristal peuvent être considérés comme appartenant à différents plans de celui-ci. La réflexion des rayons X, par les plans imaginaires

interférences entre les ondes diffusées par les électrons des différents atomes qui le composent seront constructives. Ces interférences ne seront constructives que si les ondes réfléchies par tous les plans parallèles du cristal sont en phase. On exprime cette condition de diffraction par la loi de Bragg:

$$2d_{hkl} \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda$$

où d correspond à l'espacement entre deux plans parallèles, θ à l'angle de réflexion des rayons X sur ces plans, n à n'importe quel nombre entier et λ à la longueur d'onde.

La construction d'Ewald est une représentation schématique et pratique de la diffraction des rayons X par un cristal (figure 105). Les faisceaux incidents de rayons X parallèles et de longueur d'onde λ sont représentés, dans l'espace réciproque, par une sphère de rayon 1/λ, dont le centre sera aligné sur l'axe des rayons X incidents (et donc à une distance de 1/λ du centre du cristal). La diffraction des rayons X ne peut avoir lieu que lorsqu'un nœud du réseau réciproque, contenu dans la sphère de résolution (de rayon 1/d), entre en contact avec la sphère d'Ewald (de rayon 1/λ).

Chaque nœud du réseau réciproque est désigné par trois indices, *h*, *k*, et *l*, et correspond à un plan de réflexion particulier du cristal. Le réseau réciproque a pour origine le centre du cristal (*h*=0, *k*=0, *l*=0) et est, intrinsèquement, centrosymétrique. De ce fait, les réflexions d'indices *h*, *k*, *l,* ont la même intensité que celles d'indices -*h*, -*k*, -*l* ; cette propriété du réseau réciproque découle de sa centrosymétrie et est énoncée par la loi de Friedel (cette loi ne s'applique pas si le cristal est sujet au phénomène de diffusion anomale).

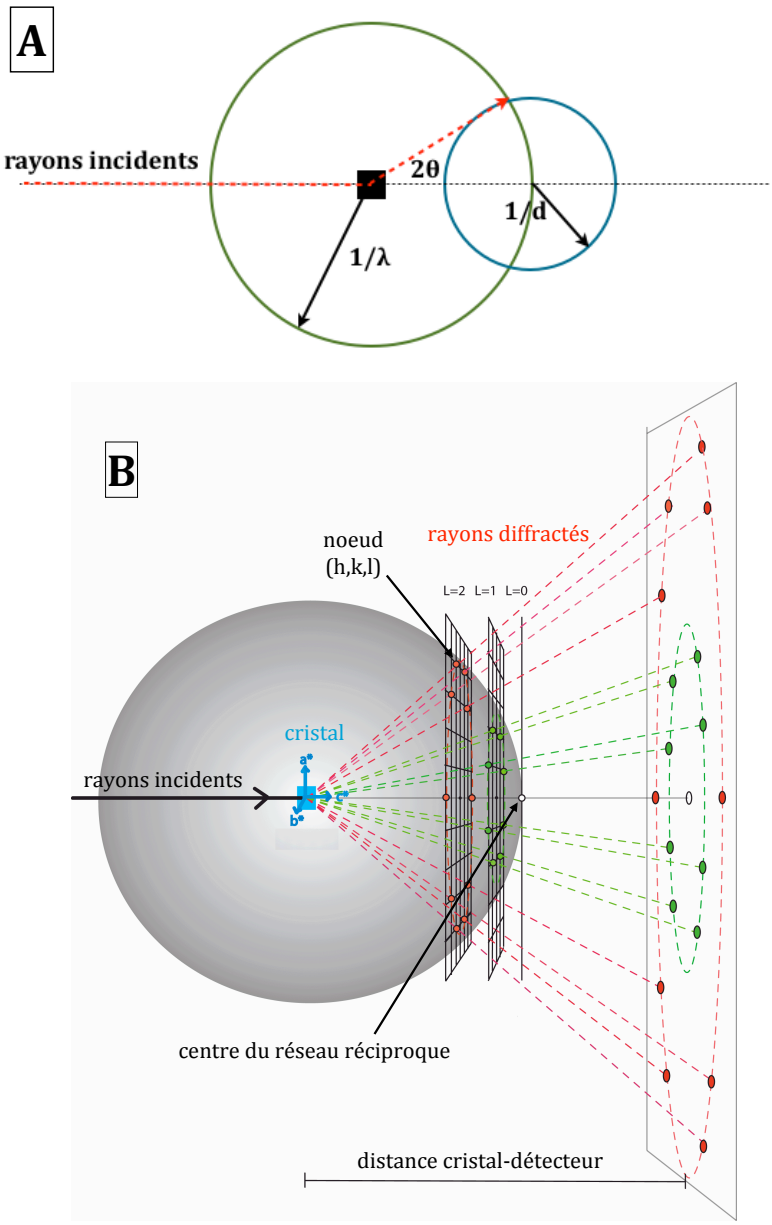


Figure 105 : Construction d'Ewald pour une expérience monochromatique (source : http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Data/data.html). (A) Les nœuds du réseau réciproque contenus dans les sphères de résolution de rayon 1/d (cercle bleu) donnent lieu aux réflexions lorsque les rayons diffractés entrent en contact avec la sphère d'Ewald de rayon 1/λ (cercle vert). (B) Le vecteur de diffusion, qui joint le centre du cristal et le nœud d'indices h, k, et l, permet de prédire le point d'impact des rayons X réfléchis sur le détecteur (cercles rouges et verts sur le détecteur).

L'exposition des cristaux aux rayons X s'effectue dans un synchrotron, nos expériences ont eu lieu à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble. Cet instrument a pour but de produire des rayons X à partir d'électrons accelérés à grande vitesse (figure 106). Des électrons sont successivement accélérés dans un accélérateur linéaire puis circulaire. Ils sont ensuite injectés dans l'anneau de stockage dans lequel ils tournent à une vitesse proche de celle de

la lumière (300 000 km.s^{-1}), avec un énergie qui dépend du synchrotron (6 milliards d'eV à l'ESRF de Grenoble). Dans l'anneau de stockage (844 m de circonférence à l'ESRF de Grenoble), des aimants de courbure contraignent les électrons à suivre une orbite stable. A chaque courbure de leur trajectoire, les électrons perdent de l'énergie par rayonnement, collecté à différents endroits, appelées lignes de lumière. Ce rayonnement est une lumière extrêmement intense qui couvre une gamme de longueurs d'ondes allant de l'infra-rouge (780 nm à 500 µm) aux rayons X (10 nm à 10 pm), incluant le visible et l'ultra-violet. C'est au bout de ces lignes que sont montés les échantillons (cristal) servant de cible au faisceau lumineux. Derrière cet échantillon, les rayons diffractés sont détectés par des appareils de mesure, variables selon le type d'expérience.
Lors de nos travaux, différentes lignes de lumière de l'ESRF de Grenoble ont été utilisées pour la collecte des données.

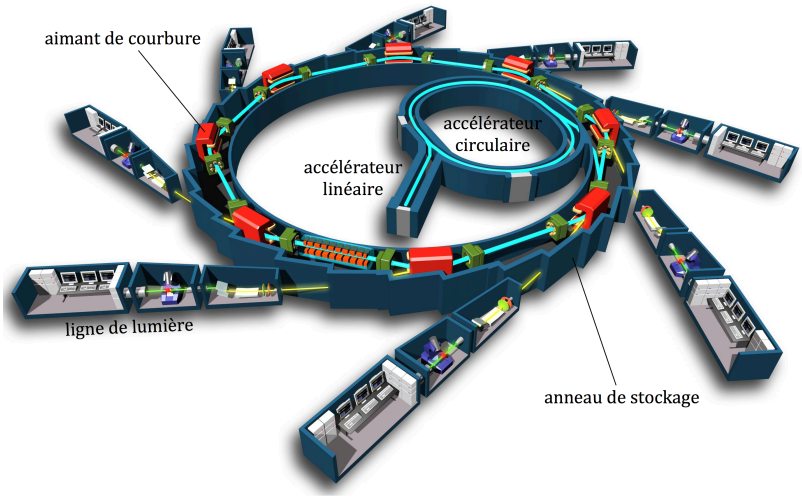


Figure 106 : Schéma de fonctionnement d'un synchrotron (source : Synchrotron Soleil)

Sur la ligne de lumière, l'échantillon est exposé au faisceau lumineux, rayons X dans notre cas. Le cristal diffracte alors les rayons X selon un modèle de tâches (spot), appelées réflexions. L'intensité de ces réflexions est enregistrée sur un détecteur bidimensionnel en arrière de l'échantillon. L'intensité de chaque tâche de diffraction est fonction de la distribution des atomes dans la maille. L'information de la structure est contenue dans le faisceau diffracté.
Les réflexions au centre de l'image correspondent aux faibles résolutions et celles plus extérieures aux hautes résolutions. On peut ainsi, à partir des premières images, estimer la limite de résolution de la structure. L'organisation et l'aspect

des tâches permettent de renseigner sur l'arrangement de la molécule dans le cristal, la distribution des atomes ou encore la mosaïcité du cristal (élargissement des tâches dû au mauvais alignement cristallin). Ainsi, la qualité du cristal peut être évaluée à cette étape ainsi que la pertinence de poursuivre la collecte. Il n'existe pas de relation directe entre les coordonnées d'un atome et les tâches de diffraction car tous les atomes contribuent à toutes les réflexions et inversement. La structure de la molécule est résolue dans sa globalité.

Une seule image ne suffit pas pour la construction du cristal entier. Sur son support, le cristal subit une rotation, étape par étape, chaque angle permettant la collecte d'une image de diffraction. C'est ainsi que sont enregistrées jusqu'à 180 images (180°) afin d'obtenir un jeu complet de données. Le nombre d'images nécessaires à l'obtention d'un jeu complet dépend de la symétrie présente dans le cristal et donc de la nature de l'empilement de la protéine. Dans certains cas, un cristal peut subir des dommages trop importants lors de la collecte du fait de l'irradiation, et plusieurs jeux issus de plusieurs cristaux doivent être fusionnés afin d'obtenir un jeu complet de données.

2-3. Le traitement des données de diffraction

Un jeu complet d'images est traité à l'aide de logiciels infomatiques en suivant trois étapes:

- L'**indexation** des réflexions permet de déterminer les paramètres de la maille (dimensions a, b et c et angles α, β et γ) et d'attribuer à chaque réflexion un point du réseau réciproque, réseau observé sur les clichés de diffraction. Ce réseau réciproque est la transformée de Fourier du réseau cristallin, c'est-à-dire que ces dimensions et ces centres de symétries sont inversés par rapport au réseau cristallin. Chaque point du réseau réciproque, et donc chaque réflexion, possède des coordonnées appelées indices de Miller (indices h, k, l). Selon les paramètres de la maille, le cristal appartient à un système cristallin différent dans lequel différents groupes d'espace existent (tableau 107). Dans chacune de nos expérimentations, nous préciserons le groupe d'espace ainsi que les paramètres de maille associés.

Système cristallin	Paramètres de maille	
	dimensions	*angles*
Triclinique	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Monoclinique	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90° ; \beta \neq 90°$
Orthorombique	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Quadratique	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Rhomboédrique	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90°$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90° ; \gamma = 120°$
Cubique	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$

Tableau 107 : Systèmes cristallins et paramètres de mailles associés

- Pour des raisons diverses, intrinsèques au cristal (mosaïcité) et à l'appareillage (largeur et divergence du faisceau incident), les réflexions peuvent être plus ou moins étalées voire dédoublées. L'étape d'**intégration** vise à corriger ces imperfections d'enregistrement en établissant un profil moyen de chaque spot et d'en calculer une intensité de réflexion (différence d'intensité entre le spot et le bruit de fond). Une erreur sur cette intensité calculée est également estimée (σ_I).
- Théoriquement, une réflexion mesurée sur deux images différentes possède la même intensité. Or, du fait de la forme du cristal et de sa dégradation par les rayons X au cours de la collecte, … ce n'est pas le cas. Les intensités équivalentes pour chaque image subissent une **mise à l'échelle** et sont moyennées afin d'obtenir l'ensemble des réflexions uniques.

Le logiciel XDS (Kabsch 2010) utilisé pour le traitement des données effectue automatiquement toutes ces étapes. On obtient un fichier contenant toutes les réflexions uniques associées à leur intensité moyenne (I) et à la déviation standard de mesure sur celle-ci (σ_I). Ponctuellement, un autre logiciel, MOSFLM (Battye, Kontogiannis *et al.* 2011), a été utilisé en cas d'échec d'indexation avec le logiciel XDS.

2-4. L'affinement de la structure

Les données de diffraction vont permettre de calculer une carte de densité électronique, représentation tridimensionnelle de la position des électrons et donc de celle des atomes.

Chaque réflexion unique est caractérisée par une intensité qui dépend de l'**amplitude** et de la **phase** de l'onde diffractée. C'est à partir de l'amplitude et de la phase que l'on peut, par le calcul, obtenir la position des électrons des atomes du cristal. Malheureusement, la phase n'est pas connue et doit être retrouvée pour chaque réflexion à partir d'informations complémentaires aux données de diffraction. Pour cela, plusieurs méthodes sont possibles. Nous avons utilisé le **remplacement moléculaire**. Cette méthode est basée sur la possibilité de calculer des phases à partir d'un précédent modèle atomique de la protéine ou d'un modèle d'une protéine structuralement très proche. Le modèle initial est positionné dans la maille jusqu'à ce que le calcul de phases s'ajuste au mieux aux données de diffraction. Si ce modèle est trop éloigné de la structure présente dans le cristal, les phases calculées seront trop différentes des phases exactes et la position du modèle ne pourra pas être établie ou, au mieux, la carte initiale de densité électronique sera de mauvaise qualité.

Lorsque la carte initiale de densité électronique est obtenue à partir du remplacement moléculaire, l'affinement du modèle moléculaire permet progressivement d'ajuster les facteurs de structure calculés à partir du modèle (Fc) (amplitudes et phases) à ceux expérimentalement observés (Fo) (intensités). La carte de densité électronique **2Fo-Fc** génère une densité électronique autour du modèle, donne plus de poids aux données expérimentales, mais reste fortement biaisée par les phases qui ne proviennent que du modèle. Une seconde carte **Fo-Fc** est calculée pour mieux mettre en évidence les différences entre le modèle calculé et la structure réelle. Les pics de densité négative dans cette carte indiquent les éléments présents dans le modèle mais qui ne le sont pas dans les données expérimentales et, inversement, les pics de densité positive indiquent que des atomes sont manquants dans le modèle par rapport aux données expérimentales. Les cycles d'affinement tendent à améliorer les cartes afin que Fc soit le plus proche possible de Fo. L'affinement est pondéré par l'introduction de contraintes géométriques, rendant compte de la chimie des éléments constitutifs d'une

protéine et nécessaires à l'obtention d'un modèle valable. Ces contraintes concerneront, typiquement, les longueurs de liaison covalentes, les angles de liaisons, les angles de torsion, etc… Plus la résolution d'un jeu de données sera élevée et plus on pourra se permettre de diminuer le poids des contraintes géométriques par rapport à celui des rayons X.
La structure finale obtenue reste un modèle car les coordonnées de chaque atome ne reflètent qu'une interprétation plausible de la carte de densité électronique. De la résolution dépendent la finesse et l'interprétabilité.

Différents paramètres informant sur le qualité du jeu de données ainsi que sur celle du modèle obtenu à partir de ces données sont quantifiables :
- la **résolution** traduit la précision des détails des cartes de densité électronique. Plus la limite basse de la résolution est faible, plus les cartes de densité électronique seront fines et détaillées (figure 108).

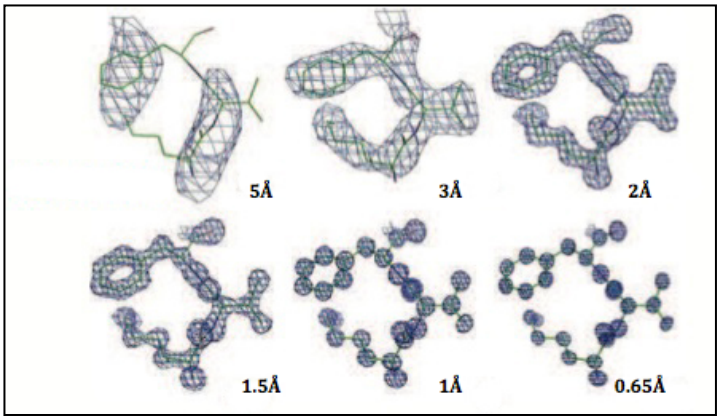


Figure 108 : Représentation de cartes de densité électronique obtenues à différentes résolutions pour le même tripeptide.

- la **complétude** renseigne, pour une résolution donnée, la proportion de réflexions mesurées par rapport au nombre total de réflexion théoriques. L'idéale est d'atteindre une valeur la plus proche possible de 100 %.
- la **redondance** évalue le nombre de fois qu'une réflexion unique est mesurée lors de la collecte. La mesure de l'intensité moyenne de cette réflexion est d'autant plus précise que la redondance est importante.
- le **rapport signal sur bruit** (I/σ_I) permet de comparer l'intensité moyenne mesurée à l'erreur qui lui est imputée. Plus ce rapport est grand, meilleure est l'estimation de cette intensité moyenne.

- le **facteur R_{sym}** permet de comparer l'intensité de chaque réflexion équivalente par la symètrie du cristal (I_{hkl}) par rapport à la moyenne de ces intensités (‹I›). La cohérence du jeu des données s'améliore avec la diminution de ce facteur.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \left| I_{hkl} - \langle I \rangle \right|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

- le **facteur R** (« **R-factor** ») donne une idée de la qualité du modèle en mesurant le manque d'accord entre les facteurs de structure observés (Fobs=Fo) et les facteurs de structure calculés (Fcalc=Fc). Plus ce facteur est bas, meilleur est l'accord entre le modèle et les données mesurées.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| \left| F_{obs} \right| - \left| F_{calc} \right| \right|}{\sum_{hkl} \left| F_{obs} \right|}$$

- le **facteur R-free** (« **free R-factor** ») mesure l'accord entre le modèle cristallographique proposé et un jeu d'environ 1000 réflexions (pour la représentativité statistique) qui sont exclues du processus d'affinement. Ce facteur est fortement corrélé à la précision des phases et permet de détecter des biais correspondant à une compensation des erreurs du modèle (et donc, erreurs de phases) par les erreurs des mesures.
- le **facteur B** (« **B-factor** ») traduit l'agitation des atomes autour d'une position moyenne dans le cristal. Celle-ci est dépendante de la température, de la compacité du cristal et de la flexibilité intrinsèque de la protéine. Selon les zones de la protéine, un atome peut posséder un facteur B de 10 $Å^2$ dans les zones très rigides et inversement, jusqu'à 70 $Å^2$ dans les zones très désordonnées.

Les programmes utilisés pour le remplacement moléculaire, MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010) et pour l'affinement de la structure, REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.* 1997), appartiennent à la suite logiciel CCP4 (1994 ; Winn, Ballard *et al.* 2011). Le logiciel COOT (Emsley and Cowtan 2004 ; Emsley, Lohkamp *et al.* 2010) permet l'affichage des structures et des cartes de densité électronique et la construction du modèle.

3. Expérimentation

Quelle que soit la protéine, la technique de cristallisation que nous avons utilisée est celle par diffusion de vapeur en goutte suspendue. L'étude cristallographique a porté sur la compréhension de la structure et du mécanisme de complexation de ces protéines, inhibées ou non par un composé organophosporé (soman, VX,…) avec des ligands non covalents (réactivateurs bifonctionnels, agents alkylants, oximes, …). Différentes méthodes existent pour obtenir un complexe entre la protéine et un OP et/ou un ligand. La première méthode s'emploie à former le complexe en solution puis de le cristalliser (méthode nommée « co-cristallisation »). La seconde méthode nécessite deux étapes : cristalliser la protéine native puis plonger les cristaux un certain temps dans des solutions d'OP et/ou de ligands (méthode de « trempage »). Dans notre étude, ces deux méthodes ont été employées (tableau 109).

Méthode de cristallisation	**Avantages**	**Inconvénients**
« co-cristallisation »	- liberté de positionnement des ligands dans la protéine en solution. - stabilisation de la protéine par les ligands complexés donc croissance cristalline souvent facilitée.	- inhibition par OP conduit toujours au vieillissement car mise en présence longue. - préparation des cristaux de complexes dépendante de la croissance du cristal
« trempage »	- possibilité d'inhibiton par OP sans vieillissement - préparation rapide des cristaux de complexe protéique	- possibilité de biais de positionnement des ligands dû au côté « figé » du cristal - difficulté occasionnelle de mise en œuvre, selon la protéine (ex : croissance cristaux d'hAChE nécessite fasciculine II).

Tableau 109 : Tableau comparatif des avantages et inconvénients des méthodes de cristallisation utilisées lors de nos travaux.

3-1. Etude cristallographique dans l'acétylcholinestérase humaine (hAChE)

Notre travail consistant à concevoir des réactivateurs de l'hAChE vieillie, il était logique de débuter l'étude cristallographique par celle-ci, même si l'obtention de cristaux d'hAChE exploitables est connue pour être difficile (Kryger, Harel *et al.* 2000).

La cristallisation de l'hAChE nécessite la présence de fasciculine. Ce polypeptide de 61 résidus, purifié à partir du venin du serpent Mamba noir (*Dendroaspis polylepis*), se fixe au niveau de l'entrée de la gorge du site actif de l'AChE humaine et procure des contacts cristallins supplémentaires qui favorisent la cristallisation du complexe (Kryger, Harel *et al.* 2000) (figure 110). Par ces interactions, la fasciculine augmente la stabilité thermique de l'hAChE (Carletti, Colletier *et al.* 2010).

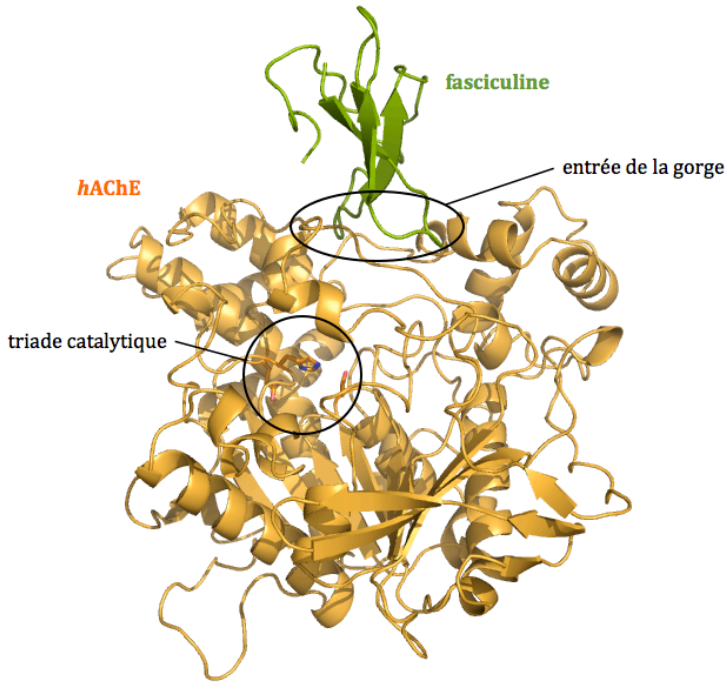


Figure 110 : Structure cristallographique du complexe entre l'hAChE (orange) et la fasciculine (vert) (S203, H447 et E341 forment la triade catalytique)(code pdb 1B41).

Le sulfate d'ammonium est utilisé comme agent précipitant dans un tampon HEPES à pH 7.4. La croissance des cristaux se réalise à 10°C, pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. En effet, les premiers cristaux d'hAChE, qui ont poussé au bout de 6 semaines, étaient trop petits (40 à 60 microns) pour obtenir une qualité de diffraction suffisante. Le second jeu de cristaux d'hAChE a été

analysé au bout de 18 mois de croissance. Leur taille était suffisamment importante (100 microns) pour obtenir des données exploitables.

Seule la méthode de « co-cristallisation » a été utilisée car la méthode de trempage nécessite une libre diffusion dans la gorge, ce qui n'est pas la cas en présence de fasciculine. Le tableau 111 regroupe les différents cristaux préparés : l'enzyme utilisée, la présence ou non d'un OP et sa nature, la nature du ligand non covalent testé, la méthode utilisée pour l'obtention des complexes protéine/ligand dans le cristal et enfin, la structure obtenue.

Protéine	**OP**	**Ligand** (cf. pages 79-80)	**Méthode**	**Résultats**
hAChE	GD	107	« co-X »	
		108		∅
		109		∅
		110		∅
		114		
		116		
		117		**hAChE-GD**
		118		**hAChE-GD**
		207		
		209		
		210		
		213		
		214		
		219		
		317		
		318		∅
		22		∅
	-	01		∅

<u>Tableau 111 :</u> Cristaux préparés pour l'obtention de complexes avec l'hAChE (OP : organophosphoré ; GD : soman ; « co-X » : co-cristallisation ; ∅ : obtention de cristaux sans données de diffraction ; case grisée : pas d'obtention de cristaux*).* Pour tous les cristaux, on a ajouté, avant la préparation des gouttes suspendues, 0.1 mM de fasciculine à la solution d'enzyme inhibée.

Malgré de nombreux essais, nous n'avons obtenu que peu de cristaux, apparaissant majoritairement comme des amas de microcristaux. Pour certains complexes, des cristaux ont été obtenus mais souvent trop petits (40 à 60 microns) pour obtenir une diffraction satisfaisante des rayons X (∅ dans le tableau 111). Deux préparations ont conduit à des cristaux de taille suffisante à l'obtention d'images exploitables : le complexe « hAChE-soman vieillie – ligand n° 117 - fasciculine » et « hAChE-soman vieillie - ligand n° 118 - fasciculine ». Malheureusement, après remplacement moléculaire et affinement, il s'est avéré que les ligands n°117 et n°118 étaient absents du site actif. Les structures obtenues correspondent à l'hAChE inhibée par le soman, avec vieillissement et en complexe avec la fasciculine (figures 113 et 114). C'est une structure inédite. Le tableau 112 regroupe les statistiques de la collecte de données et de l'affinement d'une des structures d'hAChE-soman vieillie obtenues.

groupe d'espace	*H*32
paramètres de maille (Å) (a=b , c)	151.0 245.1
source rayons X	ID23-eh1 (λ=1.004)
résolution (Å)	3.1
complétude (%)	99.0
I/σ_I	21.5
redondance	3.9
facteur R_{sym}	5.1
facteur R	0.19
facteur R-free	0.23
facteur B ($Å^2$)	41.3

Tableau 112 : Statistiques de collecte et d'affinement d'un jeu de données d'une structure d'hAChE-soman vieillie.

On retrouve la fasciculine fixée à l'entrée de la gorge (figure 113-A), en empêchant l'accès. L'interface entre la fasciculine et l'hAChE (figure 114-A) nous montre qu'entre autres, un résidu méthionine de la fasciculine interagit avec le résidu Trp286 du site périphérique.

D'autre part, la coloration des atomes en fonction du facteur B (figure 113-B) met en évidence deux zones désordonnées, l'hélice C-terminale et la boucle entre les

résidus Glu491 et Pro498, en surface de la protéine. L'hélice en C-terminale est nécessaire pour l'oligomérisation.

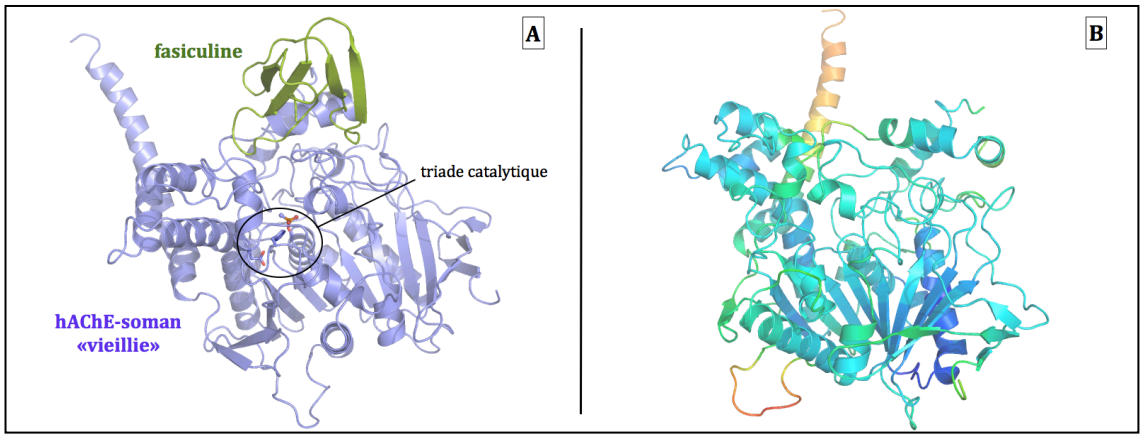


Figure 113 : (A) Structure tertiaire de l'hAChE méthylphosphonylée (violet) complexée à la fasciculine (vert)(Dans le cercle noir est situeé la triade catalytique dont la sérine est méthylphosphonylée). (B) Représentation de la structure tertiaire de l'hAChE en fonction du facteur B (La coloration est dépendante du degré d'agitation des atomes : du bleu, le moins agité, avec une valeur de facteur B faible au rouge, le plus agité, avec une valeur de facteur B élevée, en passant par le vert, le jaune et l'orange)

Nous n'avons pas identifié de densité positive dans la carte électronique |2Fo-Fc| autre que celle associée au méthylphosphonyle dans le site (figure 114-B). Cette densité positive traduirait la présence d'une entité dans les données expérimentales mais absente du modèle utilisé. Malheureusement, l'absence de densité positive suffisamment importante pour représenter un ligand traduit l'absence de ligand non covalent (n°117 ou n°118) dans le site actif de l'hAChE vieillie obtenue.

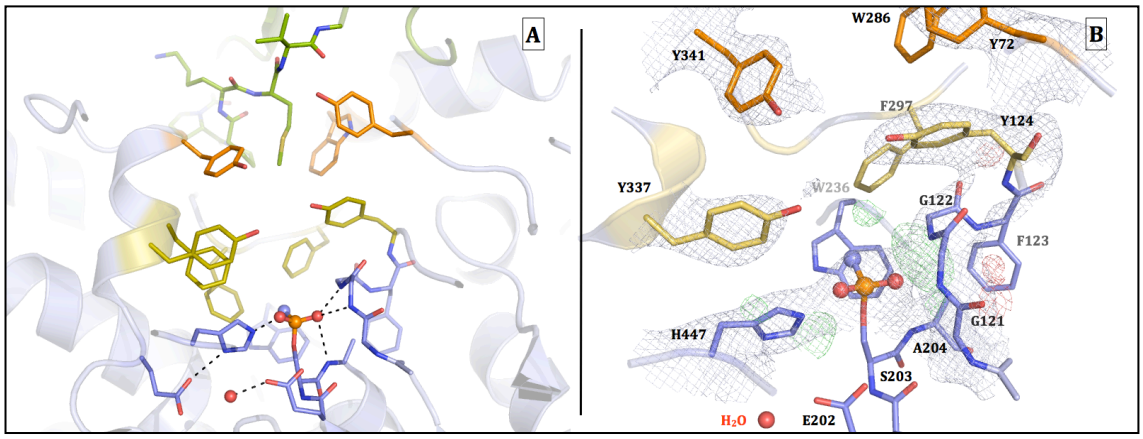


Figure 114 : (A) Structure secondaire de la gorge de l'hAChE méthylphosphonylée complexée à la fasciculine (Les résidus de la fasciculine sont en vert, les résidus à l'entrée de la gorge de l'hAChE sont en orange, les résidus le long de la gorge sont en jaune et les résidus du site actif au fond de la gorge sont en violet) (B) Représentation de la structure de la gorge de l'hAChE méthylphosphonylée obtenue par cristallographie aux rayons X et les cartes de densité électronique associées (La carte |Fo-Fc| à 1.0σ est en violet et les cartes |2Fo-Fc| à -3.0σ et à 3.0σ sont respectivement en rouge et en vert)(Le méthylphosphonyle, correspondant à l'adduit de soman désalkylé, est représenté en sphère. Les atomes de phosphore sont en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène. Les sphères rouges libres sont les molécules d'eau).

En comparant la structure des sites actifs de l'hAChE native (code pdb 1B41) de l'hAChE dont la sérine est méthylphosphonylée (« vieillie »), on observe peu de variation dans l'orientation des résidus (figure 115). Dans l'hAChE native, l'histidine catalytique His447 forme une liaison hydrogène avec l'oxygène de la sérine catalytique Ser203 alors que dans l'hAChE « vieillie », il y a formation d'un pont salin entre un oxygène de l'adduit, ce qui induit une légère réorientation de His447. Des liaisons hydrogène avec le trou oxyanion (Ala204, Gly121, Gly122) stabilisent l'adduit (figure 114-B). Glu334 et Glu202 sont également déplacés car ils s'ajustent au déplacement de His447. Enfin, Tyr337 adopte une orientation légèrement différente sans que cela n'affecte la topologie du site actif.

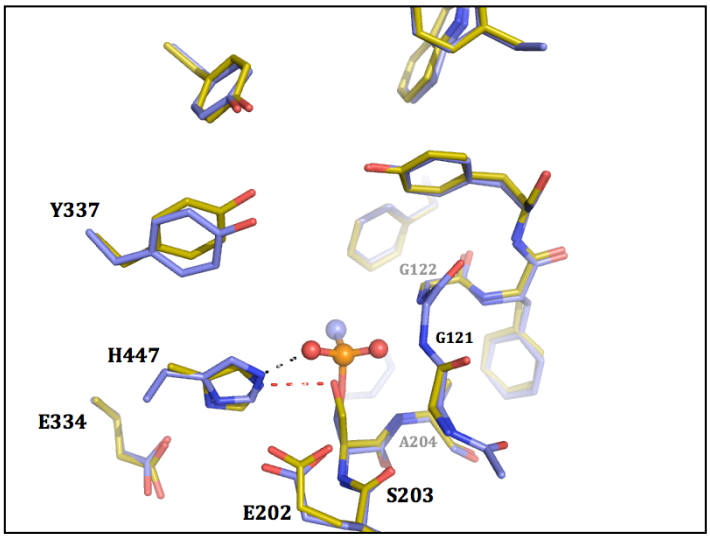


Figure 115 : Superposition des structures cristallographiques des sites actifs de l'hAChE native (jaune) (code pdb 1B41) et de l'hAChE méthylphosphonylée (violet) (L'atome de phosphore est en orange, les atomes d'azote en bleu, les atomes d'oxygène en rouge. Les pointillés représentent les liaisons hydrogène. Les atomes du méthylphosphyle sont représentés en sphère).

Etant donné les difficultés à obtenir des cristaux d'hAChE qui diffractent suffisamment pour permettre la collecte et l'exploitation des données collectées, nous avons décidé de travailler sur des cristaux d'acétylcholinestérase de souris (*m*AChE).

3-2. Etude cristallographique dans l'acétylcholinestérase de souris (*m*AChE)

La *m*AChE possède de nombreuses similitudes avec l'hAChE. En comparant les séquences en acides aminés de l'acétylcholinestérase humaine recombinante et celle de souris, on constate que sur les 544 acides aminés, seuls 41 résidus varient soit moins de 8 % de la séquence. Pour la majorité de ces variations de séquence, les acides aminés sont de même nature (apolaire, polaire, acide ou basique) et ont un encombrement stérique proche (ex : mutation Ala ⇔ Thr). La triade catalytique Ser203, His447 et Glu334 ainsi que la majorité des résidus de la gorge sont conservées (figure 116). L'alignement de la structure tertiaire des deux enzymes montre qu'elles sont quasiment identiques (rmsd = 0.7 Å), en particulier au niveau des résidus du site actif (rmsd = 0.3 Å). Mise à part la position de quelques résidus (Tyr337, Tyr341 et Asp74) qui varient légèrement, le reste du site actif est largement conservé tant dans la nature des résidus que dans leur orientation. Ainsi, même s'il convient de rester prudent, les résultats obtenus à partir d'une étude

cristallographique dans la *m*AChE peuvent être raisonnablement extrapolés à l'hAChE.

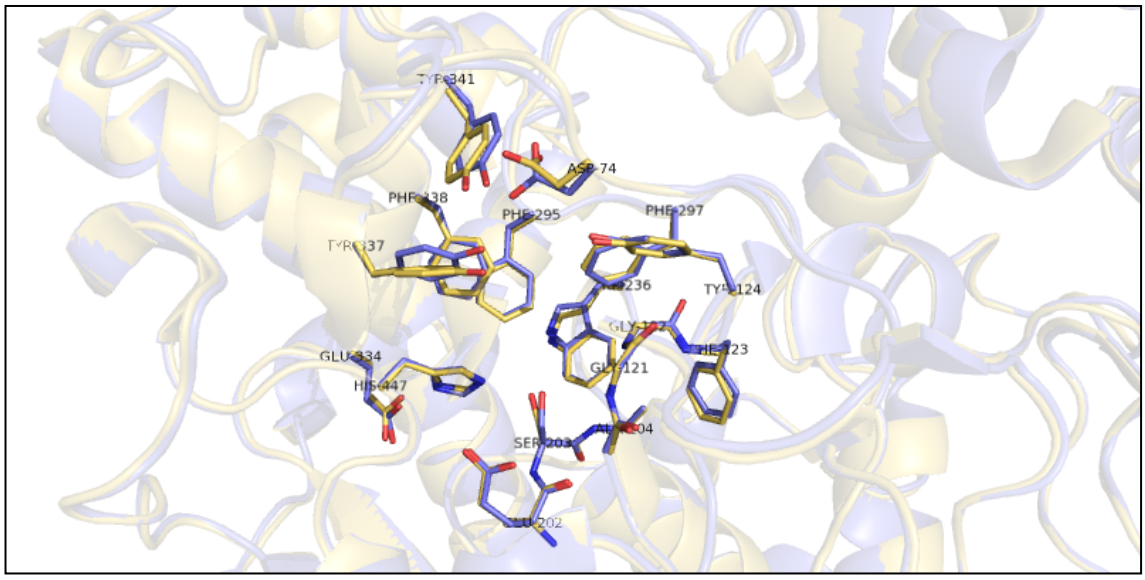


Figure 116 : Superposition des structures cristallographiques des sites actifs de l'hAChE native (violet) (code pdb 1B41) et de la mAChE native (jaune) (code pdb 1J06) (Les atomes d'azote sont en bleu, les atomes d'oxygène en rouge).

La cristallogenèse de la *m*AChE a été optimisée au laboratoire. Les cristaux croissent à 4°C dans un tampon bicine à pH 9.0, en présence de 1.7 M de sulfate d'ammonium . Le tampon bicine pH 9.0 est remplacé par du tampon Tris pH 7.4 au cours des trempages et de la cryogenèse car la bicine est décarboxylée par les rayons X lors de la collecte, ce qui entraîne la formation d'un dégagement gazeux de CO_2 qui interfère sur la qualité des données. Le double intérêt des cristaux de *m*AChE est qu'ils sont de taille plus importante que ceux de l'hAChE (de l'ordre de 200 à 400 µM, soit au moins 5 à 10 fois plus gros) et ne nécessitent pas de fasciculine, ce qui rend la gorge plus accessible et les trempages plus efficaces.
Le tableau 117 regroupe les différentes expériences de cristallogenèse qui ont aboutit à une collecte de données à l'ESRF.

Protéine	OP	Ligand (cf. pages 79-80)	Méthode	Résultats
*m*AChE	-	01	« trempage»	***m*AChE**
	VX	01	« trempage»	***m*AChE**
	GD	-	« co-X »	***m*AChE-GD**
	GD	318	« trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	110	« trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	109	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	110	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	112	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	113	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	114	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	117	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	317	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	318	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	320	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**
	GD	321	« co-X » « trempage»	***m*AChE-GD**

Tableau 117 : Cristaux préparés pour l'obtention de complexes avec la mAChE (OP : organophosphoré ; GD : soman ; « co-X » : co-cristallisation*).*

Plusieurs de ces cristaux on été analysés sans jamais qu'un ligand non covalent puisse être identifié dans le site actif de la *m*AChE. Nous avons systématiquement obtenu la structure de la *m*AChE méthylphosphonylée (inhibée par le soman et vieillie) (tableau 118 et figure 119).

groupe d'espace	*P212121*
paramètres de maille (Å) (a, b, c)	137.6 173.6 223.7
source rayons X	ID14-eh1 (λ=0.993)
résolution (Å)	3.15
complétude (%)	99.1
I/σ_I	14.7
redondance	3.7
facteur R_{sym}	9.8
facteur R	0.18
facteur R-free	0.23
facteur B ($Å^2$)	47.6

Tableau 118 : Statistiques de collecte et d'affinement d'un jeu de données d'une structure de la mAChE-soman vieillie.

Le groupe d'espace est *P*212121 et 4 molécules de mAChE sont présentes par unité asymétrique. Les molécules de *m*AChE sont agencées en dimère de dimères (figure 119-A). Deux molécules d'un dimère interagissent par formation d'un "fagot" de 4 hélices ou "four helix bundle" impliquant l'hélice Asp372-Tyr382 et l'hélice C-terminale Ala526-Thr543 (cercle noire, figure 119-A). Il s'agit du dimère biologique que l'on retrouve dans toutes les cholinestérases.

La structure du site actif diffère peu de celui de l'hAChE inhibée par le soman et vieillie. On retrouve les mêmes interactions, entre l'oxyanion du méthylphosphonate et l'imidazolium de l'histidine catalytique ainsi que celles avec les azotes de la chaine pricipale des résidus formant le trou oxyanion (Gly120, Gly121, Ala204) (figure 119-B).

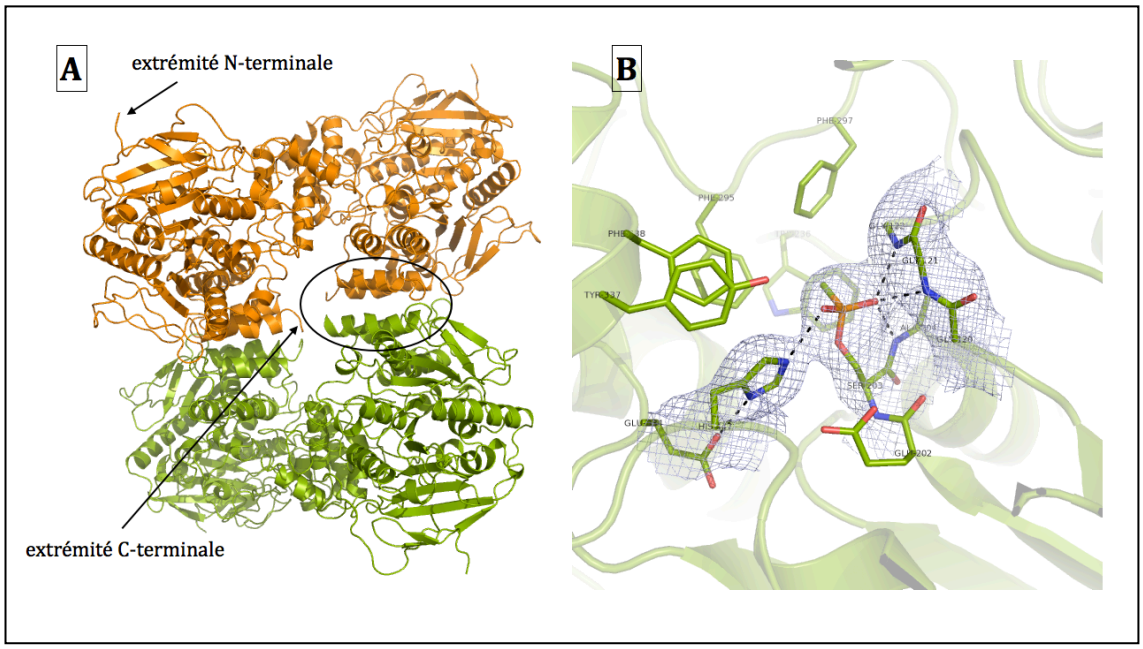


Figure 119 : (A) Représentation de la structure tertiaire d'un dimère de dimères obtenue à partir d'un cristal de mAChE (un dimère en orange et un dimère en vert)
(B) Structure du site actif de mAChE vieillie (Les atomes de carbone sont en vert, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, l'atome de phosphore en orange. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène. La carte de densité électronique $|Fo-Fc|$ à 1.0σ est en bleu).

L'absence de résultats quant à l'obtention d'une structure d'AChE « vieillie » en complexe avec un des ligands, réactivateurs bifonctionnels ou agents alkylants, nous a conduit à tester ces ligands dans la BChE, même si ces molécules n'étaient pas vouées à être employées pour cette enzyme au départ et même si nous n'avons pas les constantes d'affinité de nos ligands pour cette enzyme. Néanmoins, la résolution d'une structure mettant en évidence la complexation de ce type de molécules dans la BChE « vieillie » peut permettre de concevoir de nouveaux composés spécifiques de la BChE. Comme nous l'avons vu précédemment, la BChE possède un avenir certain en tant que bioépurateur et il y a actuellement un regain d'intérêt pour la conception de réactivateurs de cette enzyme.

3-3. Etude cristallographique dans la butyrylcholinestérase humaine (BChE)

La BChE est également une protéine dont la production, la purification et la cristallisation ont largement été optimisées au laboratoire. Tout comme la *m*AChE, les cristaux ont une taille de l'ordre de la centaine de microns. Les cristaux de BChE croissent en tampon MES 0.1 M à pH 6.5, en présence de sulfate d'ammonium à 2.1 M. Ils poussent à 20°C en deux à trois semaines. Parmi les cristaux préparés et

analysés par diffraction aux rayons X (tableau 120), deux préparations ont abouti à la résolution de structure de BChE inhibée par le soman et vieillie en complexe avec le ligand n°113 d'une part et avec le ligand n°318 partiellement hydrolysé d'autre part.

Protéine	**OP**	**Ligand** (cf. pages 79-80)	**Méthode**	**Résultats**
BChE	GD	01	« co-X » pour GD ; « trempage» pour ligand	**BChE-GD**
		113		**BChE -GD-113**
		114		**BChE -GD**
		116		**BChE -GD**
		117		**BChE -GD**
		318		**BChE -GD-318 hydrolysé**
		320		**BChE -GD**

Tableau 120 : Cristaux préparés pour l'obtention de complexes avec la BChE (OP : organophosphoré ; GD : soman ; « co-X » : co-cristallisation*).*

3-3-1. Structure BChE-soman vieillie en complexe avec le ligand n°113.

Les données expérimentales ont permis d'obtenir une structure dont les données statistiques sont les suivantes :

groupe d'espace	*I422*
paramètres de maille (Å) (a=b , c)	154.2 133.9
source rayons X	ID23-eh1 (λ=1.004)
résolution (Å)	2.45
complétude (%)	99.3
I/σ_I	21.8
redondance	4.0
facteur R_{sym}	5.0
facteur R	0.19
facteur R-free	0.24
facteur B ($Å^2$)	31.2

Le ligand n°113 interagit bien au niveau du site actif de la BChE vieillie (figure 121). Le cycle méthylpyridininum forme une interaction cation-π avec Trp82 de la poche « choline » tandis que le cycle 2,3,4,5,6-fluorobenzyle forme des interactions aromatiques avec Tyr332 à l'entrée de la gorge. Néanmoins, il est raisonnable de se demander si le ligand n°113 présent est intact. En effet, la présence d'une densité négative (en rouge) au niveau de la liaison N-O du bras reliant les deux cycles laisse à penser que celle-ci pourrait être partiellement rompue (non représentée). La présence de densité positive (en vert) à proximité de l'oxygène de ce même bras va également dans ce sens. Il est possible que la liaison soit coupée entre l'azote et l'oxygène, ce dernier se positionnerait alors à l'endroit où se situe cette densité positive. La fonction oxime serait alors détruite.

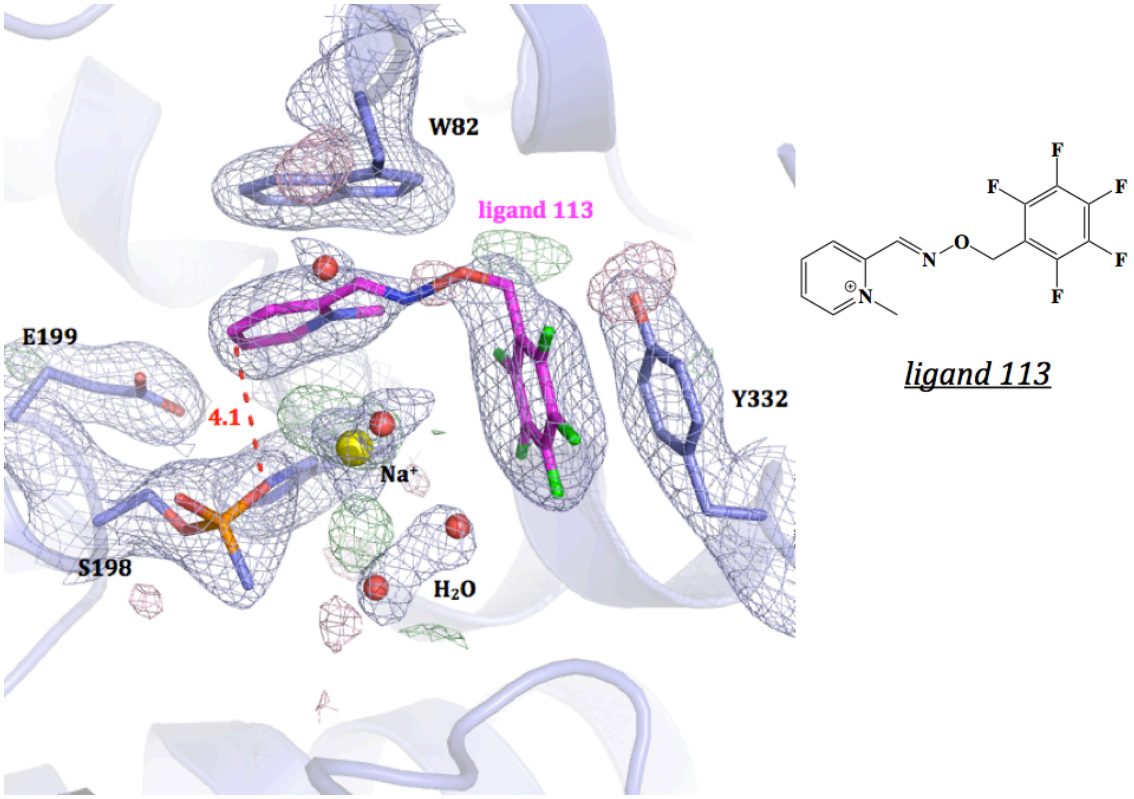


Figure 121 : Structure de la gorge de la BChE méthylphosphonylée en complexe avec le ligand n°113 et les cartes de densité électronique associées (La carte |Fo-Fc| à 1.0 σ est en violet et les cartes |2Fo-Fc| à -3.0 σ en rouge et à 3.0 σ en vert. Les atomes de carbone de la BChE sont en violet, ceux du ligand n°113 en magenta, l'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, les atomes de fluor en vert, l'ion sodium en jaune. Les pointillés rouges représentent la distance minimale entre l'atome d'oxygène cible du méthylphosphonyle et le ligand n°113).

Pour cette conformation du ligand n°113, le carbone benzylique réactif est à 8.1 Å de l'oxygène du méthylphosphonyle. Cette distance est trop élevée pour envisager

une alkylation. Par contre, l'atome de carbone en para du cycle méthylpyridinium se positionne à 4.1 Å de l'oxygène cible du méthylphosphonyle et devient une position d'intérêt pour y attacher une fonction alkylante.

Nous rappelons que le ligand n°113 a également été utilisé dans les études cristallographiques dans l'hAChE et la mAChE mais que l'analyse des données n'avait pas révélé sa présence dans le site actif des AChEs. En superposant les structures des sites actifs de l'hAChE vieillie (qui est identique à celui de la mAChE vieillie) et de la BChE vieillie, on comprend que la nature des résidus du site actif de l'AChE empêche le mode de liaison du ligand n°113 comme dans la BChE (figure 122).

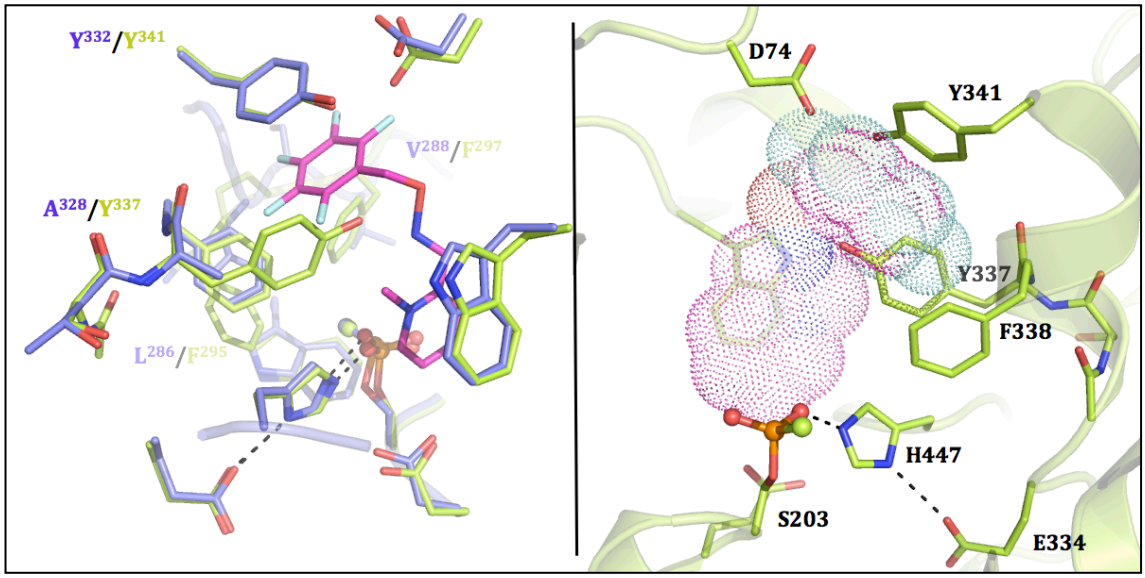


Figure 122 : Superposition des structures de la gorge de la BChE vieillie en complexe avec le ligand n°113 (violet) et de la gorge de l'hAChE vieillie (vert) (figure de gauche) (Les atomes de carbone de la BChE sont en violet, ceux du ligand n°113 en magenta et ceux de l'hAChE vieillie en vert. L'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, les atomes de fluor en vert. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène). Représentation de l'encombrement stérique du ligand n°113 dans le site actif de l'hAChE vieillie (figure de droite) (Le volume du ligand n°113 est représenté en points colorés selon la même légende que la représentation de gauche).

En effet, le résidus aromatique Tyr337 de l'hAChE (et de la mAChE) est remplacé par une alanine (Ala328) dans la BChE. Tyr337 se situe au même endroit dans le site actif de l'hAChE qu'une partie du cycle benzène portant les atomes de fluor (figure 122). L'espace libre dans le site actif est plus important dans la BChE, d'autant que la présence de 5 atomes de fluor sur le cycle benzylique en augmente le volume.

3-3-2. Structure BChE-soman vieillie en complexe avec le ligand n°318.

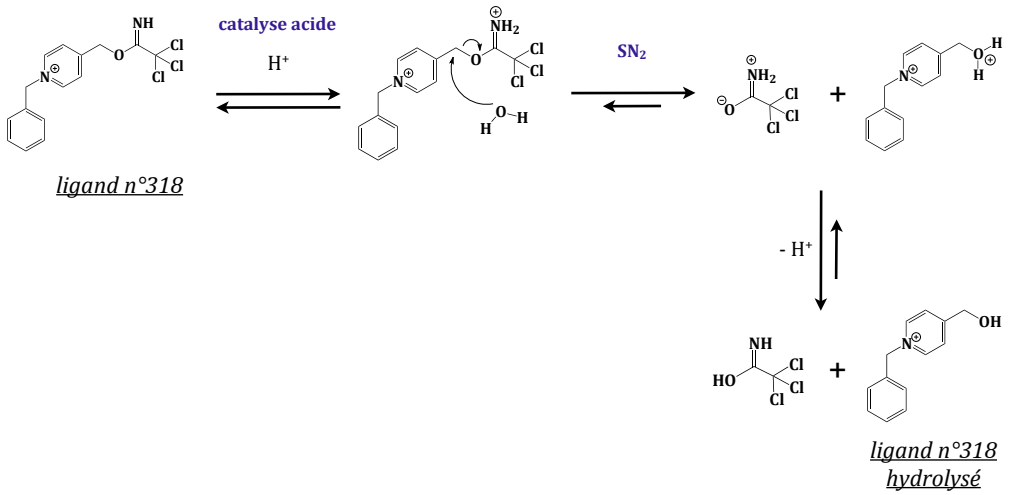
Les statistiques associées à la collecte et l'affinement de la structure de BChE vieillie complexée au ligand n°318 sont les suivantes :

groupe d'espace	*I422*
paramètres de maille (Å) (a=b , c)	155.5 128.4
source rayons X	ID23-eh1 (λ=1.004)
résolution (Å)	2.35
complétude (%)	99.5
I/σ_I	23.2
redondance	6.8
facteur R_{sym}	6.4
facteur R	0.17
facteur R-free	0.23
facteur B ($Å^2$)	29.7

Tout comme le ligand n°113, le ligand n°318 se fixe dans le site actif de la BChE vieillie (figure 123). Il est stabilisé, d'une part, par interaction cation-π entre son cycle pyridinium et Tyr332 et, d'autre part, par interaction aromatique entre son cycle benzène et le cycle à 5 atomes de l'indole de Trp82. Un atome de brome, contre-ion du ligand n°318 dans la synthèse, interagit avec le cycle à 6 atomes de l'indole du Trp82. A noter que l'occupation du ligand n°318 et du brome sont toutes deux partielles (environ 80 %).

Deux possibilités d'interprétation des cartes sont rencontrées, aucune d'elles ne permettant l'alkylation du méthylphosphonate : soit le ligand n°318 a été hydrolysé (figure 123), soit il est présent dans son intégralité avec deux positions alternatives en ce qui concerne l'orientation du bras réactif (figure 124) et avec un taux d'occupation difficile à définir pour chacune des deux positions alternatives.

Dans le cas d'une hydrolyse du ligand n°318 au niveau de l'oxygène, le mécanisme proposé est le suivant :



Par catalyse acide, le groupe trichloroacétamidate se protone devenant ainsi un très bon groupe partant pour une substitution nucléophile par une molécule d'eau. C'est ce mécanisme que nous attendions avec, comme nucléophile, l'oxygène du méthylphosphonate présent sur la sérine catalytique. Le produit de l'hydrolyse est le 4-méthoxy-benzylpyridinium dont le groupement hydroxyle est stabilisé par liaison hydrogène avec le réseau de molécules d'eau du site actif.

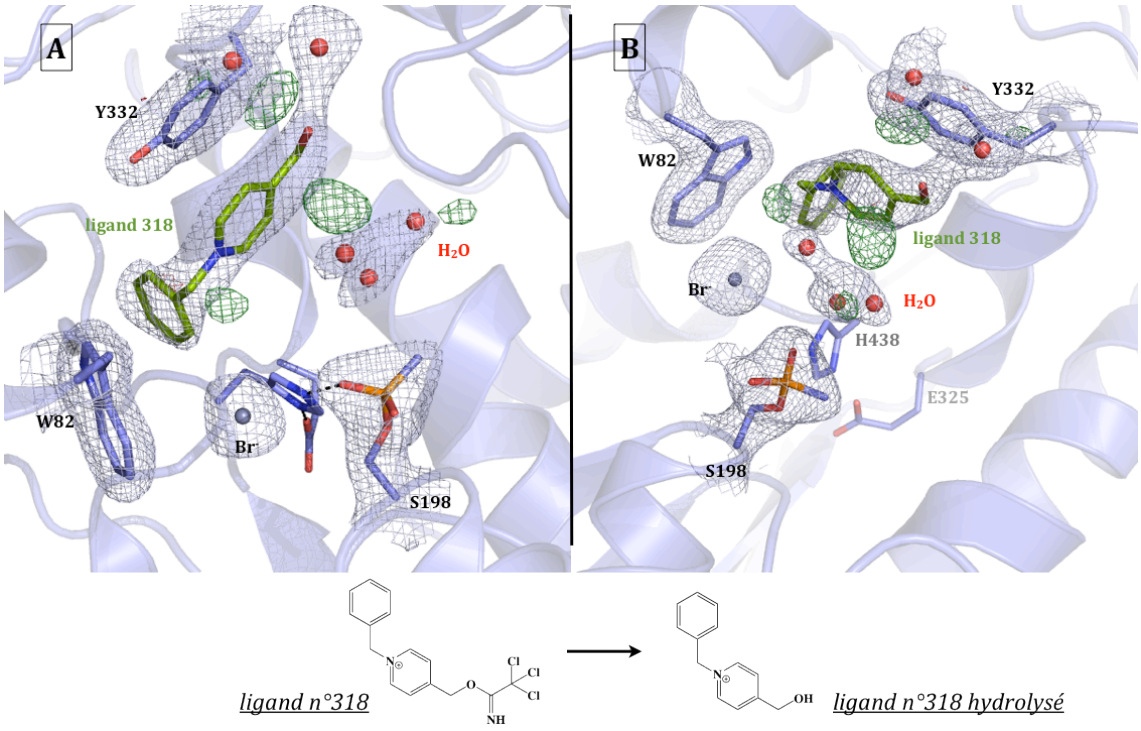


Figure 123 : Structure de la gorge de la BChE vieillie en complexe avec le ligand n°318 hydrolysé et les cartes de densité électronique associées (La carte |Fo-Fc| à 1.0 σ est en violet et les cartes |2Fo-Fc| à -3.0 σ en rouge et à 3.0 σ en vert. Les atomes de carbone de la BChE sont en violet, ceux du ligand n°318 en vert, l'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, l'ion brome en jaune. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène. Les molécules d'eau sont représentées en sphères rouges).

Un pic de densité électronique à proximité du cycle pyridinium a été modélisé par trois molécules d'eau (figure 123). Cette densité peut s'expliquer également par les des trois atomes de chlore du trichloroacétamidate mais avec une occupation très faible (figure 124-B). Après affinement de la molécule complète, on observe que l'orientation du bras réactif peut également occuper une position alternative où les trois atomes de chlore pointent vers le haut de la gorge, à proximité de Asp70 et de Ser72 (figure 124-A). Il est difficile de déterminer l'occupation de l'une et l'autre des positions alternatives d'autant que les atomes C=NH entre le cycle pyridinium et le trichlorométhyle ne sont pas définis dans les cartes de densité électronique. Il semble tout de même que les deux positions puissent être plus ou moins bien modélisées avec des occupations de 40% pour l'une comme pour l'autre.

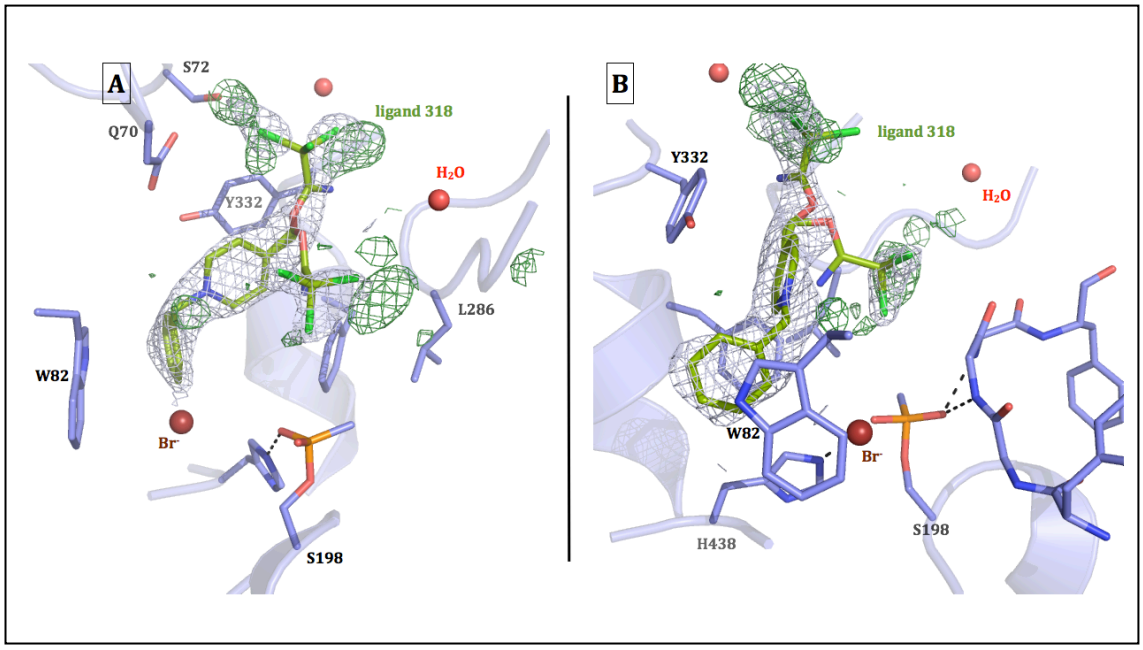
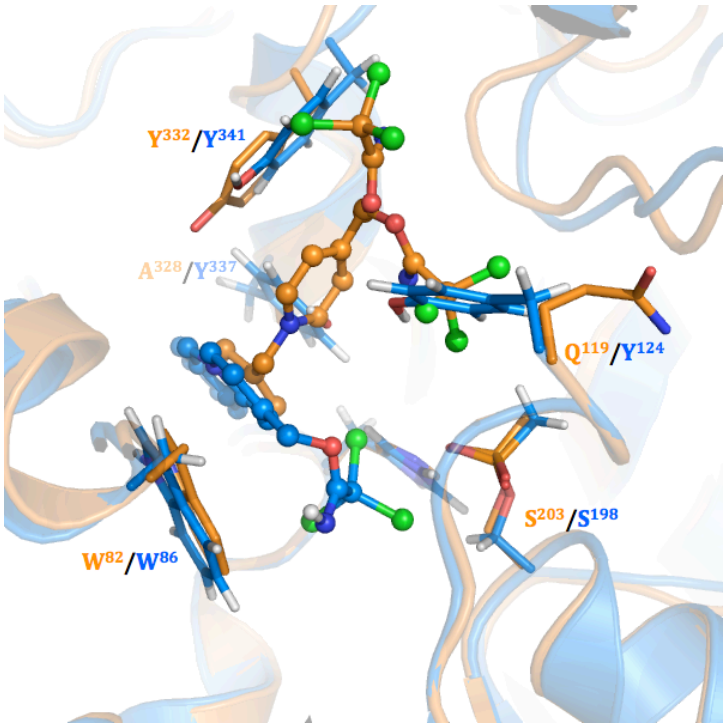


Figure 124 : Structure de la gorge de la BChE vieillie en complexe avec le ligand n°318 selon les deux positions alternatives et les cartes de densité électronique associées (La carte |Fo-Fc| à 1.0 σ est en violet et les cartes |2Fo-Fc| à -3.0 σ en rouge et à 3.0 σ en vert. Les atomes de carbone de la BChE sont en violet, ceux du ligand n°318 en vert, l'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, l'ion brome en bordeau. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène. Les molécules d'eau sont représentées en sphères rouges).

Des pics de densité positive résiduelle que l'on observe sur la figure 124 suggèrent que le groupement trichlorométhyle est relativement agité dans le site actif, pour les deux positions alternatives comme en témoignent les facteurs B élevés entre 58 et 65 $Å^2$ pour les atomes de chlore, malgré l'occupation à 40%.

La résolution de cette structure de BChE vieillie complexant le ligand n°318 ne permet pas de conclure de manière décisive sur l'intégrité du ligand présent dans le site actif et sur son orientation complète. Néanmoins, il est certain que le squelette benzylpyridinium, même s'il n'est pas présent avec 100 % d'occupation, se localise là où on l'a décrit précédemment.

Pour les mêmes raisons que celles citées pour le ligand n°113, à savoir la différence de topologie du site actif due à la présence de la Tyr337, le ligand ne peut pas se lier de manière semblable au site actif de l'AChE (figure 125).



<u>Figure 125</u> : Superposition du complexe BChE vieillie - ligand n°318 obtenue par cristallographie au rayons X (orange) et du complexe hAChE vieillie - ligand n°318, résultat du docking moléculaire (bleu clair) (L'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, les atomes de fluor en vert, les atomes d'hydrogène en blanc. Les atomes appartenant au ligand sont représentés en sphère)

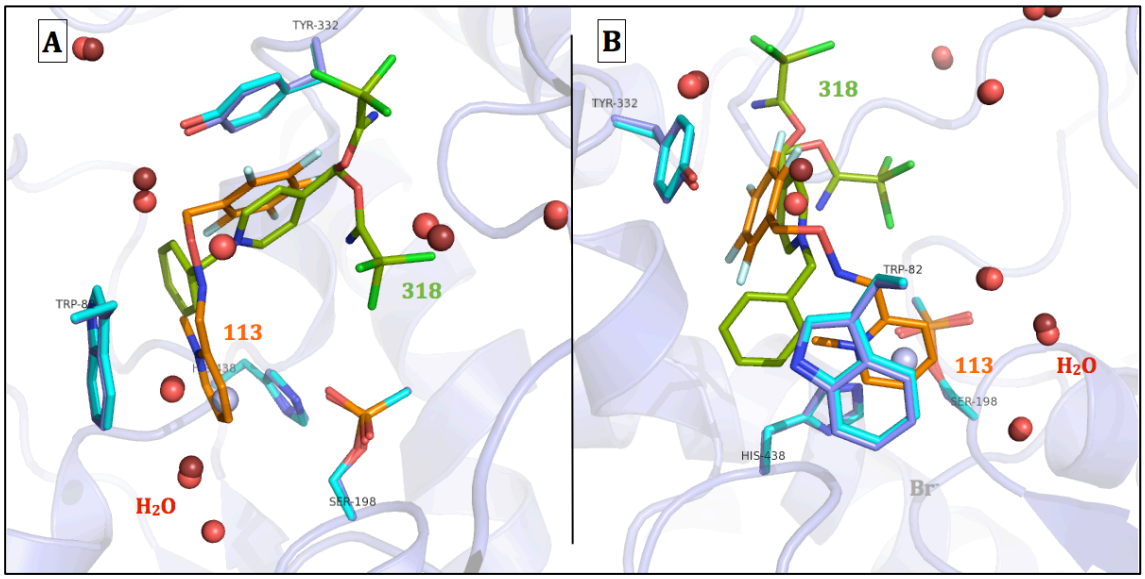
4. Discussion et perspectives

La cristallographie est un outil remarquable pour comprendre ce qu'il se passe au sein d'une protéine. L'obtention d'une structure d'AChE, humaine ou de souris, vieillie en complexe avec un des ligands nous aurait permis de mieux comprendre leur interaction avec l'enzyme ou les mécanismes permettant la réactivation de l'AChE vieillie.

C'est finalement sur la BChE que nos connaissances s'améliorent grâce à la résolution de deux structures de BChE vieillie en complexe avec les ligands n°113 et n°318. Celles-ci vont permettre le développement de réactivateurs spécifiques de la BChE. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (page 51), la BChE est la cible de nombreuses études concernant la détoxication des OPs en tant que bioépurateur naturel, soit en prévention, soit en traitement d'une intoxication. Malheureusement, à l'heure actuelle, une molécule de BChE piège une seule molécule d'OP de manière irréversible, ce qui nécessite des quantités d'enzyme de l'ordre de la centaine de mg et des injections répétées pour détoxifier l'ensemble des molécules d'OP présentes. En cherchant à réactiver au fur et à mesure la BChE inhibée, on éviterait les injections multiples .

Les structures résolues de BChE vieillie en complexe avec les deux ligands testées fournissent des bases structurales pour concevoir des réactivateurs spécifiques de la BChE inhibée pour qu'elle ne soit plus un simple bioépurateur stœchiométrique mais un bioépurateur pseudo-catalytique.

En comparant les structures de BChE vieillie complexée, d'une part, au ligand n°113, réactivateur bifonctionnel et, d'autre part, au ligand n°318, agent alkylant simple, certaines similitudes sont identifiables. Ainsi, la superposition des résidus structurant le site actif de la BChE, du site catalytique à l'entrée de la gorge, est quasi-parfaite (rmsd = 0.2 Å pour l'alignement d'environ 3400 atomes). Cette superposition s'étend à l'intégralité de l'enzyme. La figure 126 représente l'alignement des deux structures du site actif de la BChE vieillie en présence des ligands n°113 en orange et n°318 en vert.



<u>Figure 126</u> :Vue de dessus (A) et vue de face (B) de l'alignement des structures du site actif de la BChE vieillie en complexe avec le ligand n°318 (vert) et avenc le ligand n°113 (orange) (Les atomes de carbone de la BChE sont en violet pour la structure du complexe avec le ligand n°318 et en cyan pour la structure du complexe avec le ligand n°113, l'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, l'ion brome en gris. Les molécules d'eau sont représentées en sphères rouge claire pour la structure du complexe avec le ligand n°318 et en rouge foncé pour la structure du complexe avec le ligand n°113).

Les deux ligands interagissent avec les mêmes résidus du site actif que sont Tyr332 et Trp82, par stacking aromatique pour la partie benzylique et par interaction cation-π pour la partie pyridinium. Le cycle portant les substituants les plus encombrants interagit avec Tyr332 probablement en raison du plus grand espace disponible à l'entrée de la gorge, ce qui permet d'accomoder les cinq atomes de fluor du ligand n°113 et le bras trichloroacétamidate pour le ligand n°318. En revanche, on observe un léger décalage en ce qui concerne le positionnement du cycle interagissant avec Trp82, selon le ligand. Pour le ligand n°113, l'interaction du cycle pyridinium se situe plutôt du côté du cycle à 6 atomes de l'indole du Trp82, alors que le benzyle du ligand n°318 se situe du coté du cycle à 5 atomes de l'indole du Trp82, laissant la place pour un ion brome en interaction anion-π avec le noyau benzène (Demeshko, Dechert *et al.* 2004)(Schottel, Chifotides *et al.* 2008). Ce type d'interaction est généralement rencontré quand le noyau aromatique est déficitaire en électrons. L'environnement du Trp82 dans le site actif semble favorable à cette interaction.

Dans la perspective de concevoir des réactivateurs spécifiques de la BChE, sur la base du ligand n°113, il apparaît que le carbone en position 4 du méthylpyridinium est à 4.1 Å de l'oxygène du méthylphosphonate (figure 121). Il semblerait justifié

d'explorer les possibilités de greffer un substituant sur ce carbone pour envisager l'alkylation de la sérine phosphonylée.

En ce qui concerne le ligand n°318, le carbone réactif pour la substitution nucléophile se situe à 8.0 Å de l'oxygène du méthylphosphonate. Il faut donc envisager une inversion d'orientation du ligand n°318 dans le site actif, c'est-à-dire Tyr332 interagissant avec le benzyle et Trp82 avec le cycle pyridinium pour rapprocher les deux atomes nécessaires à la réaction chimique. Ainsi, le benzyle pourrait être substitué de manière à être stabilisé par les résidus situés à proximité de Tyr332, comme par exemple par la chaîne latérale de Asp70 ou de Ser72 (figure 124-A). Si on conserve l'orientation du ligand telle qu'elle l'est dans la structure, la position ortho du benzyle est la plus proche de l'oxygène du phosphonate, à 5.6 Å. En envisageant de substituer cette position par un agent alkylant, on peut émettre l'hypothèse de la réactivation de la BChE vieillie. Par exemple, en substituant la position ortho par une fonction oxime méthylée, comme pour les ligands n°02, n°22, n°101 ou n°102.

A titre comparatif, la structure de la BChE vieillie en complexe avec le 2-PAM a également été résolue à 2.45 Å lors de cette thèse (figure 127). Cette structure permet de confirmer le rôle essentiel de Trp82 pour la stabilisation de ligands non covalents portant un cycle aromatique, notamment ceux de type pyridinium. La fonction oxime réactivatrice est orientée de manière opposée à la sérine méthylphosphonylée avec la formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène de l'oxime et l'oxygène du carbonyle de la chaine principale de His438.

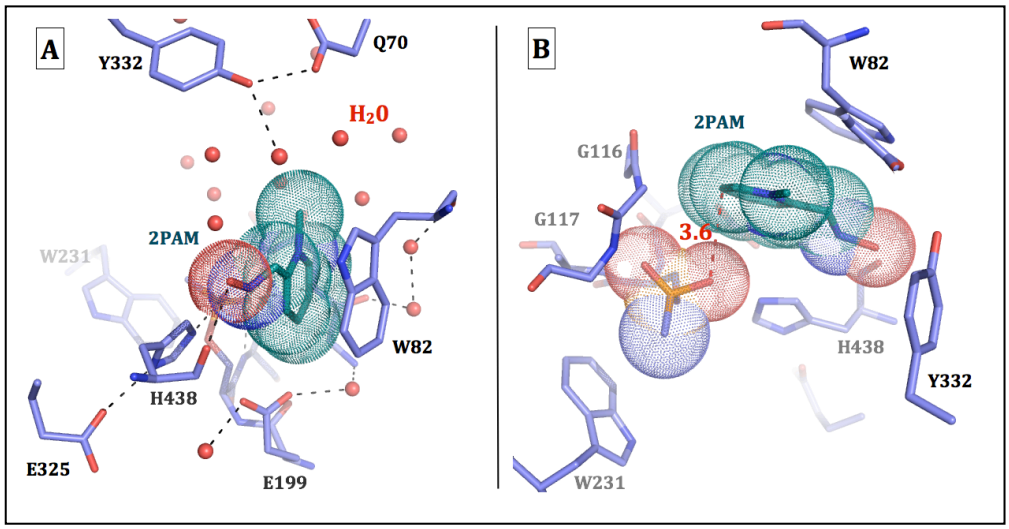


Figure 127 :Vue latérale (A) et vue de dessus (B) de la structure du site actif de la BChE vieillie en complexe 2-PAM (vert bouteille) (Les atomes de carbone de la BChE sont en violet, l'atome de phosphore est en orange, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu. Les molécules d'eau sont représentées en sphères rouges. Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène, les pointillés rouges indiquent la distance la plus courte entre l'oxygène du méthylphosphonate et le 2-PAM).

En effet, la distance entre l'oxyanion du méthylphosphonate et le carbone en position 5 du 2-PAM est de 3.6 Å. En substituant cette position avec une fonction alkylante et du fait de la proximité spatiale, il est envisageable d'obtenir une alkylation de la sérine méthylphosphonylée.

Cette position du 2-PAM dans le site actif de la BChE ne peut pas être celle qui permet la réactivation des cholinestérases inhibées avant vieillissement. En effet, Sanson *et al.* ont résolu la structure de la *Tc*AChE inhibée par le soman, avant et après vieillissement et en complexe avec le 2-PAM pour la structure vieillie (Sanson, Nachon *et al.* 2009). Il s'avère que dans la structure non vieillie, le groupement pinacolyle du soman occupe la poche « choline » interagissant avec le Trp86, celui-là même qui interagit par interaction cation-π avec le 2-PAM après vieillissement. Pour l'adduit non désalkylé, l'occupation de la poche « choline » par le pinacolyle implique que le 2-PAM doit interagir autrement qu'en stacking aromatique avec le Trp86 dans l'hAChE ou Trp82 dans la BChE, d'où la possibilité de réactivation. Cette réactivation ne semblait que peu envisageable si le 2-PAM s'orientait comme il le fait dans les structures de *Tc*AChE ou de BChE vieillies.

Tout comme les structures décrites précédemment, celle-ci peut être envisagée comme un point de départ dans la conception de réactivateurs spécifiques de la BChE vieillie.

DISCUSSION et PERSPECTIVES GENERALES

Malgré l'existence d'une Convention d'interdiction des armes chimiques, leur utilisation à des fins militaires ou civils reste une menace réelle compte tenu du contexte politique et social actuel. Les toxiques organophosphorés sont au centre des préoccupations. L'obtention d'un moyen de protection et/ou de traitement thérapeutique efficace contre les intoxications aux composés OP mobilise de nombreuses équipes de recherche au niveau international. D'un côté, le conception de nouvelles oximes, plus efficaces, apparaît comme indispensable pour le traitement et la décontamination. De l'autre, le développement de bioépurateurs stœchiométriques mais surtout catalytique œuvre dans le sens de la protection.

Malheureusement, aujourd'hui, aucun moyen n'existe pour faire face au problème du vieillissement des cholinestérases. Tous les moyens cités ci-dessus cherchent à prévenir l'intoxication ou agissent après intoxication mais toujours en amont du vieillissement. Grâce à de nombreuses études structurales et analytiques, les mécanismes de vieillissement des cholinestérases sont en majorité connus et compris. C'est dans ce contexte et avec l'objectif de pallier le manque de réactivateurs des cholinestérases vieillies que ce projet a vu le jour.

La réaction de désalkylation de la phosphonylsérine est le point critique dans le mécanisme de vieillissement. En effet, l'environnement du site actif initie et favorise cette réaction par la présence de l'histidine catalysant la réaction, de molécules d'eau, permettant l'hydrolyse de l'alkoxyle ou la capture du carbocation formé et des résidus comme notamment ceux du trou oxyanion, stabilisant l'adduit formé.

Nous avons émis l'hypothèse qu'il était envisageable, par l'action d'agents alkylants, de réverser la réaction de vieillisement, afin de retrouver un schéma classique de réactivation par les oximes existantes. Pour améliorer ce concept, la proposition de substituer la fonction alkylante et la fonction oxime réactivatrice sur une même molécule a également été envisagée.

Ainsi, plusieurs dizaines de molécules ont été designées, synthétisées puis testées. A l'heure actuelle, aucun de ces candidats n'a permis d'aboutir pleinement à l'objectif initial.

Néanmoins, il apparaît intéressant de souligner quelques points apportant un éclairage nouveau sur la stratégie choisie.

La conception de molécules à partir d'expériences de docking moléculaire ne suffit pas au screening de molécules candidates. En effet, les expérimentations réalisées *in vitro* en cinétique, notamment l'évaluation de l'affinité des ligands, ont mis en évidence des résultats contradictoires avec ceux obtenus par docking moléculaire. Par exemple, les ligands ne possédant qu'un seul cycle pyridinium apparaissaient comme les candidats les plus intéressants en docking, ce qui a été infirmé par les analyses cinétiques pour lesquelles l'obtention de données n'a pas été possible du fait d'une trop faible affinité. L'expérimentation *in vitro* reste donc indispensable avant l'exclusion de candidats dans notre démarche. Néanmoins, il faut garder en tête que les expériences de docking ont été réalisées sur un modèle d'hAChE vieillie alors que l'évaluation de l'affinité à été faite sur l'hAChE native.

L'évaluation biologique a permis de mettre en évidence les limites de nos outils d'analyse. Travailler sur l'acétylcholinestérase vieillie demande des méthodes et des techniques adaptées pour les mesures d'affinité des complexes enzyme-OP-ligands. Aujourd'hui, nous n'avons pas réussi à mettre au point une méthode fiable, mais l'arrivée prochaine d'un calorimètre de titration isotherme au laboratoire pourra apporter une solution à ce problème. Extrapoler les résultats d'affinité obtenus sur l'acétylcholinestérase native reste risqué. La présence d'un méthylphosphonate dans le site actif change la topologie du site actif et induit des interactions différentes qu'en son absence lors de la fixation des ligands.

Les ligands basés sur le noyau chloroquinoline ont ouvert des perspectives intéressantes. En effet, les expérimentations de docking ainsi que celles de l'évaluation de l'affinité et de la réactivité *in vitro* ont apporté des données encourageantes pour continuer la recherche de réactivateurs de ce type, notamment le « 7-chloro-4-aminoquinoline-2-carbaldéhyde oxime ». Cette oxime, apporte une dimension nouvelle dans la conception des oximes. Malgré une réactivité inférieure aux oximes synthétisées jusqu'à présent, sur la base du noyau pyridinium aldoxime, l'absence de charge permanente lui confère un avantage important. Des études dans la conception et la synthèse d'oximes basées sur le noyau chloroquinoline apporteront peut-être des solutions à l'intoxication des cholinestérases centrales puisqu'il permet d'envisager le passage de la BHE. La résolution d'une structure mettant en évidence le complexe entre l'AChE et cette oxime permettrait de comprendre les interactions mises en jeu ainsi que le

mécanisme de réactivation associé. Les molécules envisagées pourront alors être optimisées sur la base des données structurales acquises.

Enfin, la résolution des structures des complexes de BChE vieillie fixant certains des ligands testés rendent compte, d'une part des différences dans les modes de liaisons dans les sites des deux cholinestérases et donc de la nécessité d'une conception de réactivateurs spécifiques à chaque enzyme et, d'autre part du potentiel de la BChE en tant que bioépurateur catalytique. C'est effectivement en comparant la position et l'orientation des deux ligands dans le site actif de la BChE à la topologie du site actif de l'hAChE que l'on comprend que le site actif de l'hAChE impose des contraintes différentes. Il faut donc réfléchir à des molécules plus spécifiques de la BChE avec interaction au niveau de la Tyr332 à l'entrée de la gorge du site actif. La possibilité de concevoir des réactivateurs spécifiques de la BChE est maintenant initiée. C'est d'ailleurs dans ce but que la réactivité des ligands proposés ici devrait être évaluée sur la BChE vieillie. Cette perspective va dans la continuité du développement de cette enzyme en tant que bioépurateur. L'administration, en tant que moyen de traitement, d'un cocktail BChE-réactivateur de BChE, améliorerait considérablement les protocoles sanitaires en cas d'intoxications massives aux OP.

CHAPITRE 3 :

Etude structurale de l'énantiosélectivité de la butyrylcholinestérase humaine

Contexte de l'étude

Les OP possèdent souvent un centre asymétrique, l'atome de phosphore tétracoordiné. C'est le cas de tous les neurotoxiques de guerre. Les deux énantiomères possèdent des propriétés chimiques identiques, mais une enzyme est une molécule chirale et peut posséder une affinité différente pour l'un ou l'autre de ces énantiomères, selon la configuration de son site actif.

Dans le cas de l'acétylcholinestérase, les mesures de constantes d'inhibition montrent que ce sont les énantiomères dont le phosphore est de configuration S (P_S) qui sont les plus toxiques car ils réagissent plus rapidement sur la sérine catalytique (Benschop and De Jong 1988). C'est le cas pour le soman dont l'énantiomère P_S réagit 50 000 fois plus rapidement que l'énantiomère P_R (Ordentlich, Barak *et al.* 1999) ou pour le VX dont le rapport de constantes de vitesse d'inhibition P_S/P_R est supérieur à 350 (Reiter, Mikler *et al.* 2008). Cette stéréosélectivité de l'hAChE a pour origine la différence de volume des poches « choline » et « acyle ». Cette dernière est nettement plus petite, accommodant difficilement les substituants plus gros qu'un méthyle. La différence de volume est moins marquée pour la BChE qui exerce en conséquence une bien moindre stéréosélectivité. C'est un point important dans le cadre de l'usage de la BChE humaine dans la prophylaxie des intoxications aux OP, car si l'enzyme piège indifféremment les deux énantiomères, une quantité stœchiométrique d'enzyme sera nécessaire pour assurer une protection, quand la moitié seulement aurait été nécessaire pour une enzyme possédant la même stéréosélectivité que l'hAChE.

D'autre part, de la stéréosélectivité dépend la position des substituants dans le site actif, et de cette position peut dépendre le mécanisme du vieillissement du conjugué. Une étude visant à comprendre les rapports entre sélectivité et mécanismes d'inhibition et de vieillissement de l'AChE et de la BChE par le tabun a été réalisée au laboratoire (Carletti, Li *et al.* 2008 ; Carletti, Aurbek *et al.* 2009). Il a été montré que l'AChE et la BChE partageait la même stéréosélectivité pour le tabun, le groupement diméthylamine se retrouvant dans la poche « acyle », et le groupement éthoxyle dans la poche de fixation de la choline. Elles partagent également le même mécanisme de vieillissement par désalkylation, confirmé par spectrométrie de masse dans l'étude.

Par la suite, nous nous sommes posés la question de savoir ce qu'il se passait pour la BChE lorsque le groupement N-alkyle était plus ou moins encombrant. La poche « acyle » de la BChE est-elle suffisamment spacieuse pour accueillir un substituant N-alkyle peu encombrant? Quel sera le mécanisme de vieillissement si cet N-alkyle est finalement dans la poche « choline » ? La BChE fut donc inhibée par des analogues de tabun différant de par le nombre, la longueur et la nature de la (des) chaine(s) carbonée(s) du groupement N-alkyle (figure 128) (Carletti, Li *et al.* 2008 ; Carletti, Aurbek *et al.* 2009).

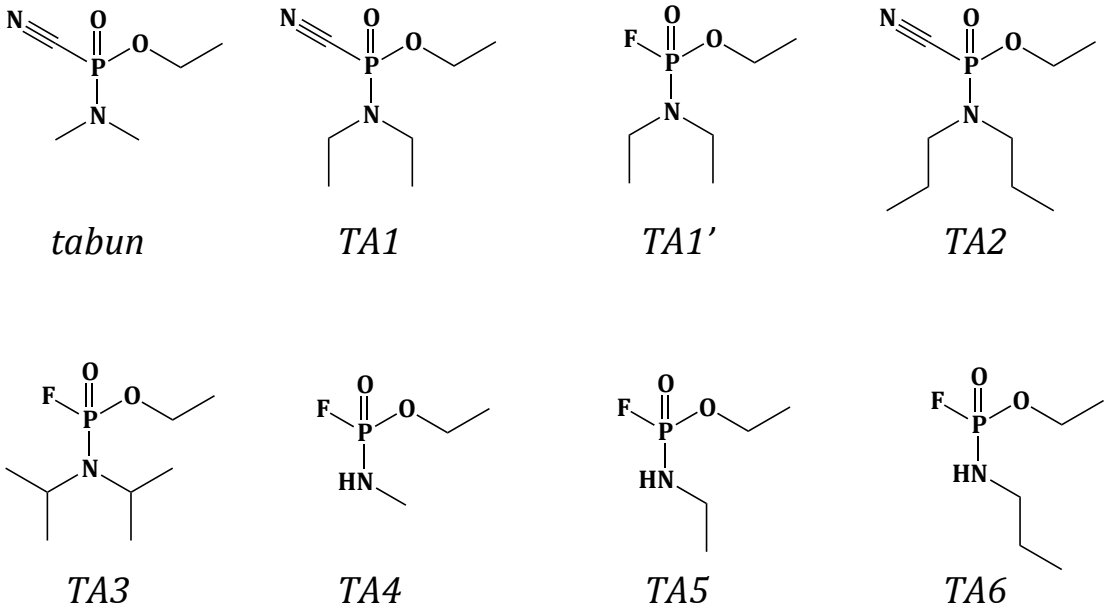


Figure 128 : Structure chimique du tabun et de ses analogues (TA)(Carletti, Aurbek et al. 2009).

Il était attendu que ces variations modifient les constantes d'inhibition de ces composés pour la BChE. Les résultats obtenus par cristallographie aux rayons X montrent que la majorité des analogues de tabun se fixent dans le site actif selon la même orientation, c'est-à-dire de manière à obtenir la configuration P_R de l'adduit phosphorylsérine. Le groupement N-alkyle interagit avec Trp231 de la poche de fixation de l'acyle et le groupement éthoxyle dans la poche de fixation de la choline conduisant, en cas de vieillissement, à une O-désalkylation.

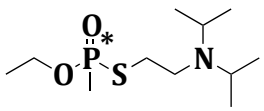
Seule exception, l'adduit de l'analogue TA4 est de configuration P_S, son substituant éthoxyle étant dans la poche de fixation de l'acyle et le groupement N-alkyle dans la poche de fixation de la choline. Il s'avère que TA4 est le seul analogue de tabun testé qui possède un substituant N-alkyle (N-méthyle) moins encombrant stériquement que le substituant éthoxyle. La BChE favorise, dans la poche « choline », le substituant linéaire à deux atomes (N-méthyle) plutôt que trois (éthoxyle). Pourtant, un vieillissement de l'adduit est bien observé et semble résulter d'une hydrolyse du groupement N-méthyle et non d'une désalkylation (Carletti, Aurbek *et al.* 2009 ; Nachon, Carletti *et al.* 2010). Ce point n'est cependant pas confirmé à ce jour.

Résultats

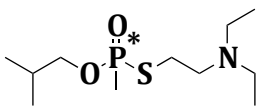
1. Inhibition de la BChE par les agents V

Cette curieuse stéréosélectivité pour le TA4 nous a naturellement amené à nous poser la question de la stéréosélectivité de la BChE pour les agents V. Les agents V portent sur le phosphore central, un oxygène relié par une double liaison, un groupement méthyle, de faible encombrement stérique, un groupement O-alkyle, plus ou moins long et ramifié et un groupe partant de type thiol (figure 129). Des études cinétiques réalisées sur l'inhibition des cholinestérases par les agents V, notamment le VX, ont mis en évidence un comportement différent selon que l'on travaille sur l'hAChE ou sur la BChE. S'en traduit un rapport des constantes d'inhibition VX_S/VX_R pour l'hAChE supérieur à 350 contrairement à celui pour la BChE de 2.4 (Reiter, Mikler *et al.* 2008). De plus, contrairement à l'hAChE, la BChE inhibée par une solution de VX ou de VR racémique ne montre pas de signe de vieillissement (Li, Schopfer *et al.* 2007).

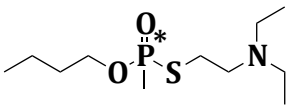
L'ensemble de ces éléments nous a conduit à réaliser une étude structurale afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la BChE et d'expliquer son comportement lors de l'inhibition par les agents V.



Diisopropylamino-éthyl-O-éthyl méthylphosphonothioate (VX)



Diéthylamino-éthyl-O-isobutyl méthylphosphonothioate (VR)



Diéthylamino-éthyl-O-butyl méthylphosphonothioate (CVX)

Figure 129 : Structure chimique des agents V, respectivement VX, VR et CVX. (indique que le phosphore est asymétrique).*

Publication 1 *:* Wandhammer *et al*., 2011, Journal of Biochemical Chemistry, Vol. 286, 19, pages 16783-16789

« Structural study of the complex stereoselectivity of human butyrylcholinesterase for the neurotoxic V-agents »

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 19, pp. 16783–16789, May 13, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Structural Study of the Complex Stereoselectivity of Human Butyrylcholinesterase for the Neurotoxic V-agents*

Received for publication, December 6, 2010, and in revised form, February 28, 2011 Published, JBC Papers in Press, March 23, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.209569

Marielle Wandhammer[‡§], Eugénie Carletti[‡], Marcel Van der Schans[¶], Emilie Gillon[‡], Yvain Nicolet[‖], Patrick Masson[‡], Maurice Goeldner[§], Daan Noort[¶], and Florian Nachon[‡1]

From the [‡]Département de Toxicologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées-CRSSA, 38700 La Tronche, France, the [§]Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 67400 Illkirch, France, the [¶]Research Group Diagnosis and Therapy, Business Unit Biological and Chemical Protection, TNO Defence, Security and Safety, 2288 GJ Rijswijk, The Netherlands, and the [‖]Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France

Nerve agents are chiral organophosphate compounds (OPs) that exert their acute toxicity by phosphorylating the catalytic serine of acetylcholinesterase (AChE). The inhibited cholinesterases can be reactivated using oximes, but a spontaneous time-dependent process called aging alters the adduct, leading to resistance toward oxime reactivation. Human butyrylcholinesterase (BChE) functions as a bioscavenger, protecting the cholinergic system against OPs. The stereoselectivity of BChE is an important parameter for its efficiency at scavenging the most toxic OPs enantiomer for AChE. Crystals of BChE inhibited in solution or *in cristallo* with racemic V-agents (VX, Russian VX, and Chinese VX) systematically show the formation of the P_S adduct. In this configuration, no catalysis of aging seems possible as confirmed by the three-dimensional structures of the three conjugates incubated over a period exceeding a week. Crystals of BChE soaked in optically pure VX_R-(+) and VX_S-(−) solutions lead to the formation of the P_S and P_R adduct, respectively. These structural data support an in-line phosphonylation mechanism. Additionally, they show that BChE reacts with VX_R-(+) in the presence of racemic mixture of V-agents, at odds with earlier kinetic results showing a moderate higher inhibition rate for VX_S-(−). These combined results suggest that the simultaneous presence of both enantiomers alters the enzyme stereoselectivity. In summary, the three-dimensional data show that BChE reacts preferentially with P_R enantiomer of V-agents and does not age, in complete contrast to AChE, which is selectively inhibited by the P_S enantiomer and ages.

The acute toxicity of organophosphorus nerve agents (OPs)[2] is due to rapid phosphorylation of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) at the neuronal synapses and neuromuscular junctions (1, 2). What follows is an accumulation of acetylcholine that leads, among other cholinergic symptoms, to respiratory failure and even death. One strategy to prevent AChE inhibition is to scavenge the nerve agent before it can reach its synaptic target. Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), abundant in human (3), functions as a natural bioscavenger of nerve agents (4, 5). A large amount of BChE injected intravenously or intramuscularly scavenges the nerve agents and protect animals against 3–5 LD_{50} of soman and VX (6). BChE purified from human plasma (Baxter Healthcare Corporation) is one enzyme source. This product is under consideration for its development as a stoichiometric bioscavenger for pretreatment of OP intoxication.

The catalytic serine of cholinesterases is located at the bottom of a gorge, surrounded by pockets, named from the part of the native substrate they bind. In AChE, the acyl-binding pocket is much smaller than the choline-binding pocket. Therefore, AChE exerts a strong enantioselectivity on chiral OPs, bearing substituents of different sizes. For example, hAChE reacts about 5×10^4 times more rapidly with P_S diastereoisomers of soman because the large pinacolyl and small methyl substituents fit, respectively, in the choline-binding pocket and acyl-binding pocket (7). The acyl-binding pocket of BChE is much wider than that of AChE and is therefore expected to be less selective for some OPs. This is important in regard to the amount of enzyme required to scavenge one equivalent of racemic nerve agent. Indeed, half an equivalent of BChE is sufficient if the enzyme binds preferably the same enantiomer as AChE. At least one equivalent is necessary if BChE binds equally both enantiomers or preferably the less toxic enantiomer.

Several lines of evidence suggest that BChE and hAChE have a different stereoselectivity for V-agents: VX, Russian VX (VR), and Chinese VX (CVX) (Scheme 1). One piece of evidence comes from a spontaneous time-dependent dealkylation of the V-agent adduct of cholinesterases, called aging, which leads to a resistance toward oxime reactivation (8). The dealkylation mechanism for alkoxy-OP adducts is stereoselective because it involves residues located in the choline-binding pocket of BChE. Accordingly, no aging will occur if the alkoxy substituent of V-agents is not pointing toward this pocket. A marginal aging rate is reported for VX-inhibited BChE ($t_{1/2}$ = 77 h), and

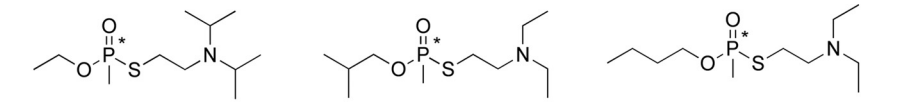
* This work was supported by Direction Générale de l'Armement under Programme d'Etude Amont Grants 08co501, ANR-06-BLAN-0163, and ANR-09-BLAN-0192 (to F. N.) and Defense Threat Reduction Agency Grant CBDIF07-THER01-2-0038 (to D. N., F. N., and M. G.).

The atomic coordinates and structure factors (codes 2XQF, 2XQG, 2XQI, 2XQJ, and 2XQK) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (http://www.rcsb.org/).

[1] To whom correspondence should be addressed: Département de Toxicologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées-CRSSA, 24 av. des Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France. Fax: 205-934-7437; E-mail: florian@nachon.net.

[2] The abbreviations used are: OP, organophosphate; AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase; CVX, Chinese VX; h, human; PDB, Protein Data Bank; VR, Russian VX; TLS, translation libration screw motion.

Downloaded from www.jbc.org at University Louis Pasteur, on July 5, 2011



Diisopropylamino-ethyl-O-ethyl methylphosphonothioate (VX)

Diethylamino-ethyl-O-isobutyl methylphosphonothioate (VR)

Diethylamino-ethyl-O-butyl methylphosphonothioate (CVX)

SCHEME 1. **Chemical structures of V-agents, VX, VR, and CVX.**

no aging could be detected for VR-inhibited BChE (9). Furthermore, mass spectrometry analysis shows that no aged adduct was detectable for BChE treated with an excess solution of racemic VX or VR (10). This suggests that for these adducts, the alkoxy substituent is usually not located in the choline-binding pocket. This contrasts with the view offered by the x-ray structure of *Torpedo californica* AChE inhibited by VX with the ethoxy substituent located in the choline-binding pocket and able to age (11). This leads to the conclusion that BChE and AChE have opposite stereoselectivity.

However, measurements of the inhibition rate of separated VX isomers by independent laboratory showed that VX_S-(−) inhibits BChE a few-fold faster than VX_R-(+), whereas the difference in rate is more than 2 orders of magnitude for hAChE (12, 13). This in turn leads to the conclusion that both cholinesterases share the same stereoselectivity for VX_S-(−) but that AChE is much more stereoselective than BChE. This is consistent with recent *in vivo* experiment showing that a molar equivalent of BChE is required to protect against racemic VX (14).

Interestingly, these early results puzzlingly suggest that the stereoselectivity of BChE differs when exposed to racemic or optically pure solutions of VX. In this structural study, we investigate, at the molecular level, which enantiomer of VX, VR, and CVX reacts preferentially with BChE. We determine the inhibition mechanism for both enantiomers of VX and give a rational explanation for the absence of aging in crystallography and mass spectrometry experiments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Caution

V-agents (VX, CVX, and VR) are highly toxic and are classified as a schedule 1 chemical as defined in the Chemical Weapons Convention. The handling of V-agents is dangerous and requires suitable personal protection, training, and facilities.

Chemicals

Racemic VX, *O*-ethyl-S-[2[bis(1-methyl-ethyl)amino] ethyl] methylphosphonothioate, VR, and CVX, were obtained from the Centre d'Étude du Bouchet-Maîtrise NRBC (Vert-le-Petit, France). Optically pure enantiomers of VX_R-(+) and VX_S-(−) were obtained from TNO (Rijswijk, The Netherlands). For the assignment of absolute configuration *R* or *S* of VX-(+/−), see Ref. 15.

Recombinant Human Butyrylcholinesterase

BChE was expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells and secreted into serum-free culture medium, and purified by affinity and ion-exchange chromatography as described earlier (16). The BChE enzyme was a truncated monomer containing residues 1–529 whose tetramerization domain was deleted.

Measurement of Inhibition Rate Constants for Pure Enantiomers of VX

BChE activities were assayed according to Ellman's method (17). BChE solution (17 nM final) was mixed with VX_S-(−) or VX_R-(+) (respectively, 21 and 88 nM final) in 100 mM phosphate buffer, pH 8.0. Each minute, 5 μl of the mixture was added to a well (96-well plate) filled with 100 μl of 0.8 mM 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in 100 mM phosphate buffer, pH 8.0. After the 7th aliquot (7 min), the wells were filled with 100 μl of 0.8 mM butyrylthiocholine in water. Absorbance was read at 412 nm immediately, then 5 min later. The net raise of absorbance is a direct measure of BChE activity. The initial concentration of VX_S-(−) is less than 2-fold the initial concentration of BChE which means that the inhibition follows second-order kinetics. The inhibition rate ki_S of BChE by VX_S-(−) was determined with the following equation,

$$\frac{1}{C - Ei} = \frac{1}{C} \cdot ki_S \cdot t \qquad \text{(Eq. 1)}$$

where *C* is the average concentration of enzyme and inhibitor (enzyme+inhibitor/2), *E*i is the concentration of the inhibited enzyme, ki_S is the inhibition rate, and *t* is time.

The initial concentration of VX_R-(+) is more than 5 times the initial concentration of BChE which means that the inhibition follows pseudo-first-order kinetics. The inhibition rate ki_R of BChE by VX_R-(+) was determined with the following equation,

$$\log\frac{A_t}{A_0} = -\frac{ki_R \cdot I \cdot t}{2.303} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

where A_t is the activity of human BChE at time *t* and A_0 at time 0, *I* is the initial concentration of VX_R-(+), ki_R is the inhibition rate, and *t* is time.

Crystals of V-agent-inhibited BChE Conjugates

BChE crystallized at a concentration of 8 mg/ml from 0.1 M MES, pH 6.5, supplemented with 2.1 M ammonium sulfate, using the hanging-drop system. The VX, CVX, and VR stock solutions were at 10 mM in 2-propyl alcohol. Crystals of conjugates were obtained using three different procedures.

Flash Soaking—Crystals of native BChE were flash-soaked into a solution containing 1 mM racemic V-agents or pure enantiomers VX for 5 min and flash-cooled in liquid nitrogen to prevent postinhibition reactions such as aging and/or spontaneous reactivation. Three soaking solutions were tested for racemic V-agents, from either 0.1 M MES, pH 6.5, or 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 or pH 8.0.

Downloaded from www.jbc.org at University of Nebraska Lincoln, on July 5, 2011

TABLE 1
X-ray data collection and refinement statistics

Enzyme	Racemate			Pure enantiomer	
	VX *in cristallo*	VR in solution	CVX in solution	VX_S-(−)	VX_R-(+)
PDB entry code	2XQF	2XQG	2XQI	2XQK	2XQJ
Data collection					
Space group	*I422*	*I422*	*I422*	*I422*	*I422*
Unit cell axes, $a = b$, c (Å)	155.1 128.1	154.6 127.6	155.2 127.0	154.9 127.4	155.8 128.3
X-ray source	ID14-eh4 (λ = 0.981)	ID14-eh1 (λ = 0.933)	ID14-eh2 (λ = 0.933)	ID23-eh1 (λ = 0.954)	
No. of reflections	409,037	249,879	223,406	214,798	284,598
Unique reflections	45,286	34,420	23,438	30,395	31,042
Resolution (Å)	48.0-2.1 (2.5-2.1)	41.5-2.3 (2.5-2.3)	49.1-2.6 (2.9-2.6)	41.5-2.4 (2.5-2.4)	49.3-2.4 (2.5-2.4)
Completeness (%)	99.2 (98.5)	99.7 (99.6)	96.0 (97.7)	99.5 (99.6)	99.9 (99.9)
R_{meas}[a] (%)	6.8 (30.8)	7.2 (48.8)	15.5 (50.4)	7.9 (48.9)	8.1 (41.5)
$I/\sigma(I)$	22.3 (7.9)	27.3 (4.8)	9.9 (4.1)	20.5 (5.3)	19.9 (6.2)
Redundancy	9.0 (8.7)	7.3 (7.4)	9.5 (9.0)	7.1 (6.9)	9.2 (9.7)
Refinement statistics					
R-factor[b] (R_{free})[c]	15.0 (18.9)	16.2 (21.4)	18.4 (24.7)	15.7 (21.7)	16.7 (22.3)
No. of atoms					
Protein	4269	4258	4258	4265	4246
Solvent	432	419	247	323	346
Others	193	185	186	183	161
Mean B-factor (Å^2)	37.1	38.1	54.0	41.2	39.7
Root mean square deviation from ideality					
Bond length (Å)	0.030	0.023	0.020	0.022	0.022
Angles (deg)	2.291	2.051	1.877	1.954	1.976
Chiral (Å^3)	0.207	0.144	0.127	0.136	0.139

[a] R_{meas} as defined in Ref. 31.
[b] R-factor = $\Sigma \mid F_o - \mid F_c \mid \mid / \Sigma \mid F_o \mid$, F_o, and F_c are observed and calculated structure factors.
[c] R_{free} set uses about 1000 of randomly chosen reflections.

Long Soaking—Crystals were long-soaked into a solution containing 1 mM racemic V-agents for 10 days to allow sufficient time for *in cristallo* aging.

Crystallization after Inhibition—Crystals were obtained from a solution of BChE first inhibited by 0.4 mM racemic V-agents in 5 mM MES, pH 6.5. In all three cases, the crystals were washed with a cryoprotectant solution (0.1 M MES, pH 6.5, with 2.3 M ammonium sulfate, containing 20% glycerol) and then flash-cooled in liquid nitrogen.

X-ray Data Collection and Structure of V-agent-BChE Conjugates

Diffraction data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France), at the ID29, ID23-1, ID14-1, ID14-2, and ID14-4 beam lines. All datasets were processed with XDS (18). The structures were solved by use of the CCP4 suite (19). An initial solution model was determined by molecular replacement, starting from the recombinant BChE structure (Protein Data Bank (PDB) entry 1P0I) from which all ligands (butyrate, glycerol, ions) and glycan chains were removed. For all diffraction data sets, the model was refined with REFMAC5 (20). An initial rigid body refinement was followed by iterative cycles of model building with Coot (21), and then restrained and TLS refinement was carried out with REFMAC5. The bound ligands and their descriptions were built using the Dundee PRODRG 2.5 server including energy minimization using GROMOS 96.1 force field.

Significant drops in R-factor and R_{free} occurred with TLS refinement. TLS groups were defined with the help of the TLS Motion Determination server (22). Refined TLS parameters are included in the deposited PDB file for each entry. Simulated annealing composite omit maps were calculated using Phenix (23) to check any bias in the model. Protein structures were illustrated using the program PyMOL.

RESULTS

Inhibition Rate Constants for Optically Pure VX Enantiomers—The bimolecular rate constant for the inhibition of recombinant BChE is $1.09 \pm 0.07 \times 10^7$ min^{-1} · M^{-1} ($n = 12$) for VX_S-(−) and $2.01 \pm 0.10 \times 10^6$ min^{-1} · M^{-1} ($n = 12$) for VX_R-(+). Thus, VX_S-(−) is only 5.4-fold more potent than VX_R-(+), in good agreement with literature data (12, 13).

X-ray Structure of Racemic V-agent-BChE Conjugates—We followed three different procedures to obtain the crystal structures of the conjugates. The flash-soaking procedure was aimed at obtaining the conjugate structure before any aging or spontaneous reactivation can take place. The long-soaking procedure intended to obtain the structure of the aged conjugate, and the procedure using inhibition in solution before crystallization was aimed at avoiding a possible enantioselectivity or aging bias introduced by the crystal packing. Still, we cannot exclude that a bias could persist during crystallization, if for example one enantiomeric conjugate crystallizes more favorably.

Whatever the procedure used, we systematically obtained identical conjugate structures with all three racemic V-agents, without any evidence for aging. The crystals belonged to the usual space group *I422*. The structures were refined at resolutions ranging from 2.1 to 2.6 Å. Data and refinement statistics for one dataset per V-agent are presented in Table 1. For each structure, a strong peak of electron density (>11σ) is observed in the $F_o - F_c$ map at covalent bonding distance of the catalytic serine Oγ, in agreement with the presence of the bound inhibitor. The oxygen of the phosphonate moiety is nested in the oxyanion hole, well stabilized by three hydrogen bonds with the main chain amide nitrogen of Gly-116, Gly-117, and Ala-199 (Fig. 1).

For all conjugates, the methyl group of the phosphonyl adducts points toward the catalytic histidine whereas the

Downloaded from www.jbc.org at University Louis Pasteur, on July 5, 2011

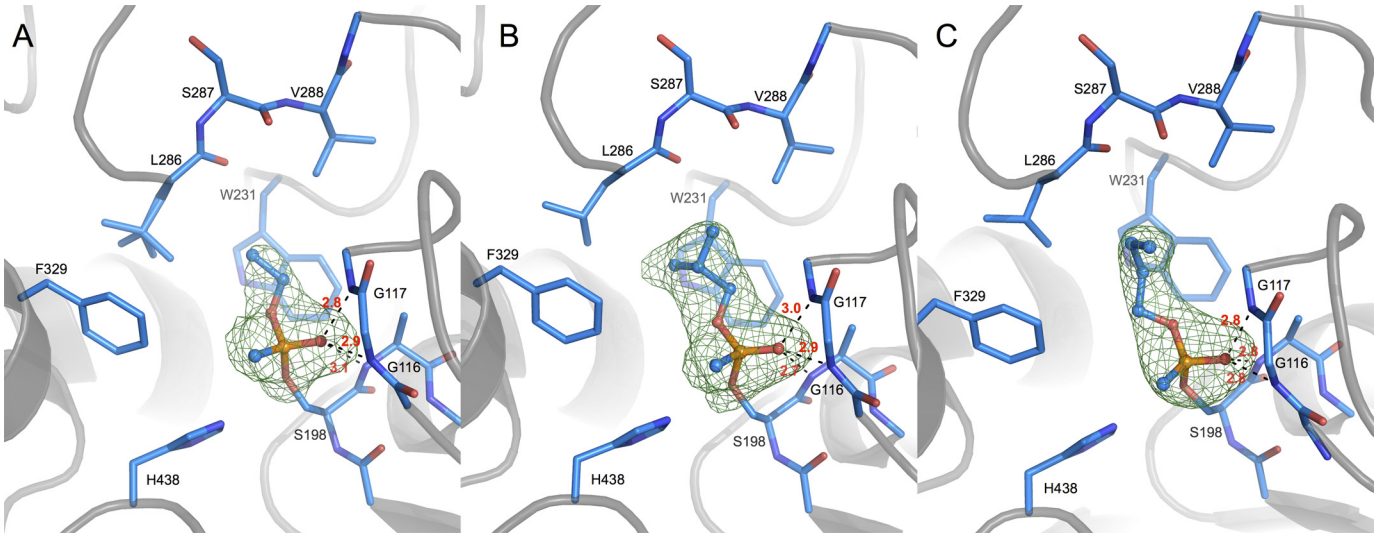


FIGURE 1. **Active site of VX-BChE (*A*), VR-BChE (*B*), and CVX-BChE (*C*) conjugates.** Crystals are obtained either by long soaking of BChE crystal in a 1 mM solution of racemic VX (*A*) or by crystallization of a solution containing 0.1 mM BChE inhibited by 0.4 mM of racemic VR (*B*) or CVX (*C*). Key residues are represented by *sticks* with carbon atoms in *blue*, oxygen atoms in *red*, nitrogen atoms in *dark blue*, and phosphorus atom in *orange*. Hydrogen bonds are represented by *black dashes*, and atomic distances are indicated in *red* (Å). Omit maps are represented in *green mesh*, contoured at 3.0 σ.

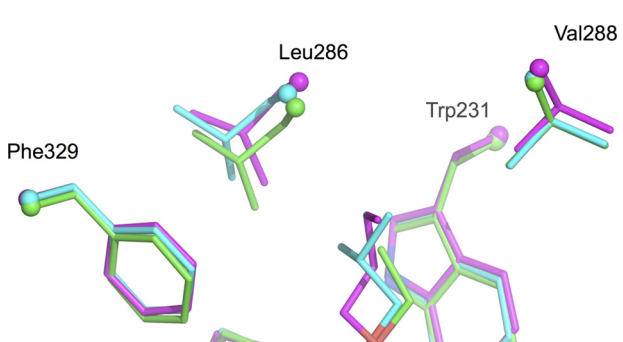


FIGURE 2. **Superimposition of the acyl-binding pocket region of VX-BChE (*cyan*), VR-BChE (*green*), and CVX-BChE (*magenta*) conjugates.** Key residues are represented by *sticks* with oxygen atoms in *red*, nitrogen atoms in *dark blue*, phosphorus atoms in *orange*. Cα atoms are represented as *spheres*.

alkoxy substituent is located in the acyl-binding pocket delimited by Trp-231, Leu-286, and Val-288 (Fig. 1). There is no doubt about the configuration assignment. The electron density maps show no evidence for the presence of the alternate configuration, *i.e.* the alkoxy group pointing toward the choline-binding pocket.

Adjustment of the acyl loop residues is observed, depending on the bulkiness of the alkoxy substituent (Fig. 2). Compared with the ethoxy substituent in the VX adduct, the isobutyloxy group of the VR adduct induces a 0.7 Å shift of Leu-286, and the *n*-butyloxy group of CVX adduct induces a 0.4-Å shift of Val-288 and 0.8-Å shift of Leu-286. Rearrangement of the acyl loop conformation was already observed for soman (24) and phosphoramidyl adducts (25). In addition, strain in the acyl-binding pocket translates into a slightly different position of the phosphonyl head for VX and CVX. The phosphorus atom shifts by 0.3 Å away from the pocket, and the phosphonyl moiety rotates about 20° around the SerOγ-P bond (Fig. 2). No other significant displacement of residues is observed compared with the native enzyme (PDB entry 1P0I).

Thus, the absolute configuration of the phosphorus atom for each adduct is P_S. The orientation of VX is identical to that observed in the recently solved structure of the VX-G117H mutant of BChE (PDB entry 2XMG) (26). This is the mirror image of the VX-*Tc*AChE adduct which is of configuration P_R: in this latter, the methyl substituent is located in the acyl-binding pocket, and the ethoxy group points toward the catalytic histidine inducing a conformational change (11).

The formation of the P_S adduct could result either from an in-line attack of VX_R-(+) with inversion of the phosphorus or an adjacent attack of VX_S-(−) and subsequent pseudorotation (27). In an effort to understand which VX enantiomer leads to the formation of the P_S adduct and what is the underlying mechanism, we solved the x-ray structure of BChE crystals flash-soaked in solutions containing pure enantiomers.

X-ray Structure of BChE Inhibited by Pure VX Enantiomers—The structures of VX_R-(+) and VX_S-(−) conjugates were solved to 2.4-Å resolution. Data and refinement statistics for one dataset per isomer are presented in Table 1.

The ethoxy substituent of VX_R-(+)-BChE conjugate is located in the acyl-binding pocket whereas the methyl points toward the catalytic histidine (Fig. 3*A*). The phosphorus atom is of absolute configuration P_S. This conformation is identical to that obtained by inhibition using a racemic mixture and in agreement with in-line phosphorylation (Scheme 2).

By contrast, the ethoxy substituent of VX_S-(−)-BChE points toward the catalytic histidine whereas the methyl group is located in the acyl-binding pocket (Fig. 3*B*). The phosphorus atom is of absolute configuration P_R, in agreement with in-line phosphorylation (Scheme 2). The two residues known to promote aging by dealkylation are close to the ethoxy group, His-

Downloaded from www.jbc.org at Universite Laval, on July 5, 2011

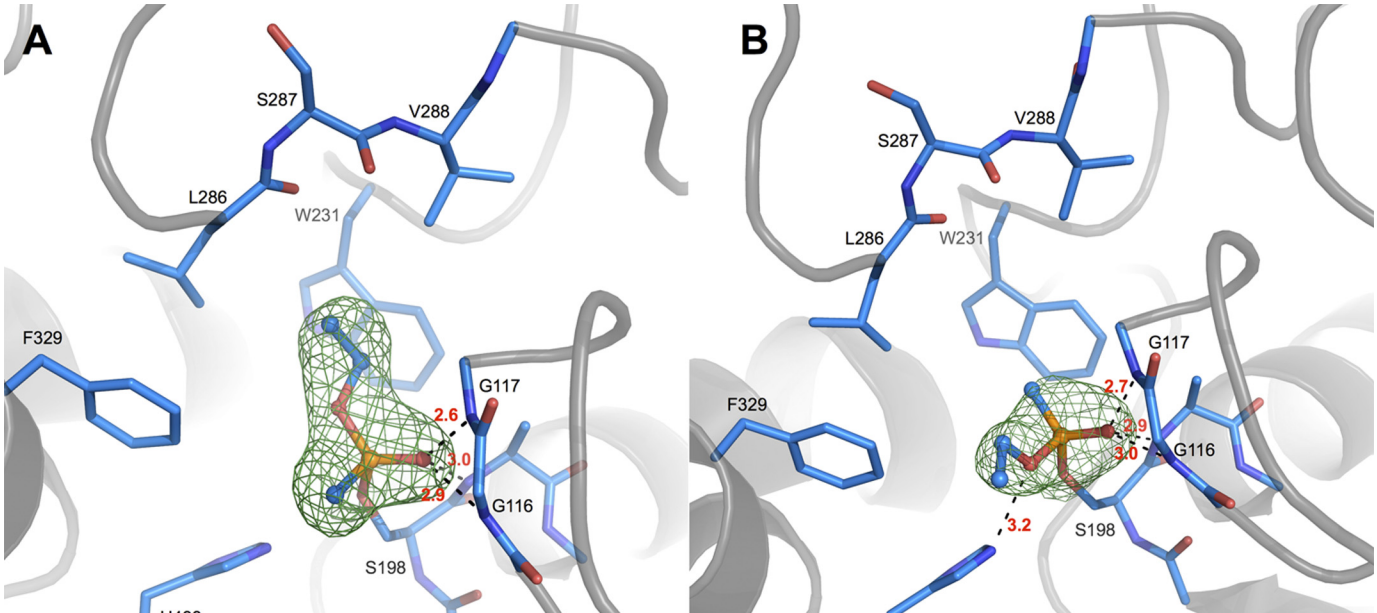
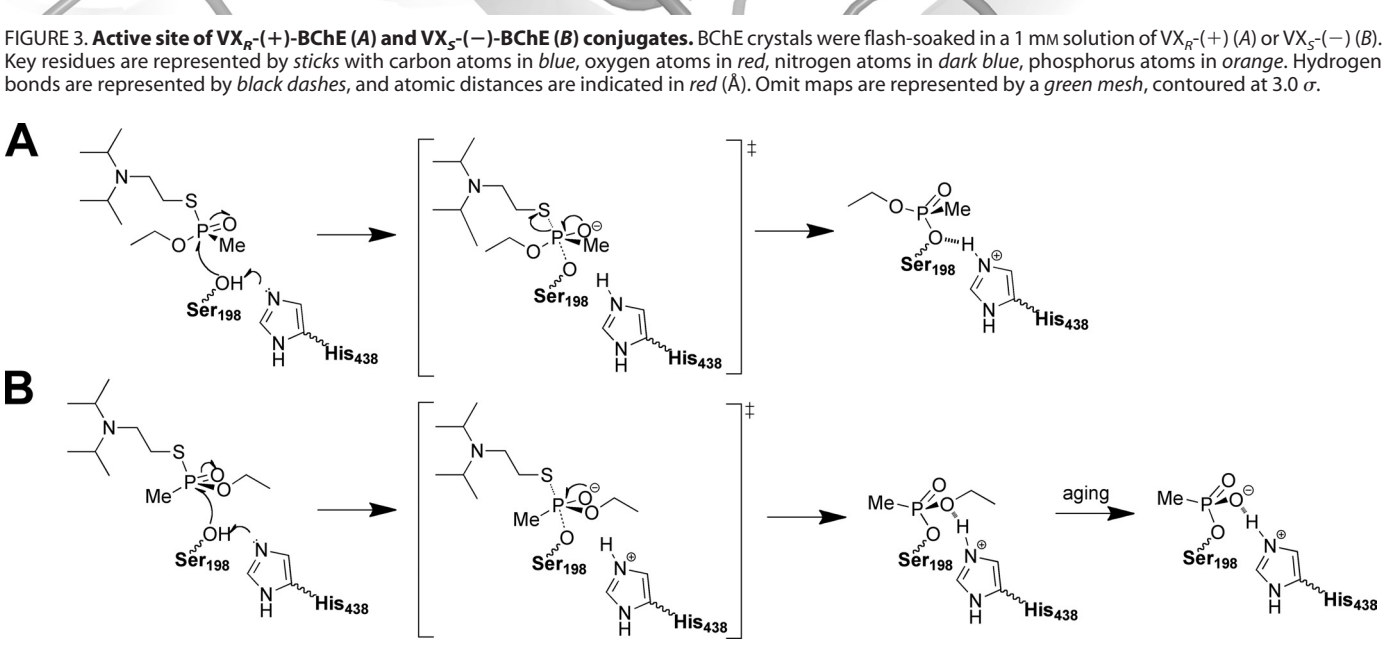


FIGURE 3. **Active site of VX_R-(+)-BChE (*A*) and VX_S-(−)-BChE (*B*) conjugates.** BChE crystals were flash-soaked in a 1 mM solution of VX_R-(+) (*A*) or VX_S-(−) (*B*). Key residues are represented by *sticks* with carbon atoms in *blue*, oxygen atoms in *red*, nitrogen atoms in *dark blue*, phosphorus atoms in *orange*. Hydrogen bonds are represented by *black dashes*, and atomic distances are indicated in *red* (Å). Omit maps are represented by a *green mesh*, contoured at 3.0 σ.



SCHEME 2. **Mechanism of inhibition of BChE by VX_R-(+) (*A*) and VX_S-(−) (*B*).**

438-Nϵ and the ethoxy oxygen being notably at H-bond distance (3.2 Å). This configuration is identical to that observed when *Tc*AChE was inhibited by racemic VX, except that no conformational change of the catalytic histidine is observed. The absence of conformational change of His-438 shows one more time that this catalytic residue is not mobile in BChE (25). These combined results suggest that in the presence of both enantiomers at submillimolar concentration, BChE will react preferentially with VX_R-(+).

DISCUSSION

We do not observe identical stereoselectivity for experiments performed in the presence of one or both enantiomers of V-agents. On the one hand, three different experiments using racemic VX, *i.e. in vivo* protection (14), mass spectrometry (10), and x-ray crystallography, show that BChE reacts preferentially with VX_R-(+) and does not age. On the other hand, kinetic experiments performed with separated VX_R-(+) or VX_S-(−) show a slight selectivity for VX_S-(−). Slow aging has been observed with VX_S-(−), $t_{1/2} \approx 50$ h, and no aging could be detected with VX_R-(+).[3] The absence of aging with VX_R-(+) is in agreement with the structural and mass spectrometry data. Noteworthy, very slow aging has been recently reported for BChE inhibited by racemic VX, $t_{1/2} = 77$ h (9). This half-time value seems to be intermediate between those of the VX_R-(+) and the VX_S-(−) conjugates.

[3] F. Worek, unpublished data.

Downloaded from www.jbc.org at Universite Louis Pasteur, on July 5, 2011

There can be many different explanations for this discrepancy. A first hypothesis is that a shift in selectivity originates from the ability to bind multiple molecules at the same time in the active site gorge, especially at high concentrations. This is illustrated in the x-ray structure of aged soman-BChE conjugate in complex with butyrylthiocholine (24). Multiple binding affects the catalytic behavior of the enzyme. For example, at a high substrate concentration, binding of a second molecule of butyrylthiocholine in the active site gorge of BChE accelerates the turnover about three times (28). Thus, it is possible that in the presence of a racemic mixture, both enantiomers bind simultaneously in the active site gorge and interfere so that VX_R-(+) is in a position more favorable for the phosphonylation. This may be favored by the high concentrations of VX required for x-ray crystallography and mass spectrometry. Aging kinetic of BChE inhibited by racemic VX could provide some clues regarding this hypothesis, but the exact concentration of inhibitor was not reported (9). Although unexplained electron density is visible in the active site gorge of the conjugate, next to Trp-82, it does not correspond to a second molecule of V-agents in which P and S atoms large electron density is easily recognizable. An alternative hypothesis is that an unknown ligand corresponding to this unexplained electron density, often present in the choline-binding pocket of BChE (24–26), could alter the binding of VX_S-(−). Yet another hypothesis could be that even if both conjugates form in solution, the VX_R-(+)-BChE conjugate crystallizes more easily. In this case there would be a crystallization artifact for inhibited BChE. But this hypothesis also requires that there should be also a crystal packing artifact, VX_R-(+) binding more favorably to crystallized BChE. At this point we have no evidence to favor one of these nonmutually exclusive hypotheses.

Predicting the stereoselectivity of BChE for VR and CVX uniquely from the active site topology is not straightforward. The question is whether the large substituent of VR and CVX can fit in the acyl-binding pocket of BChE. Some clues were provided by structural data showing that a diethylamino group (TA1) or a *N*-propylamino group (TA6) do fit in that pocket (25). Here, the x-ray structures of VR- and CVX-BChE confirm that the long *n*-butyloxy of CVX or the bulky isobutyloxy of VR do fit as well. This explains why no aging was observed during mass spectrometry analysis of the VR-BChE conjugate or kinetics experiments (9). By extrapolation from VX, the P_S adducts results likely from the in-line attack by VR_R and CVX_R, whereas we expect a strong selectivity of human AChE for VR_S and CVX_S, knowing that VX_S-(−) is at least already 100-fold more reactive than VX_R-(+) (12, 13).

From a stereoselectivity point of view, hAChE appears as a better V-agents bioscavenger than hBChE. However, titration studies show that one equivalent of hAChE or hBChE is necessary to neutralize one equivalent of racemic VX in conditions simulating the estimated initial concentrations of VX during *in vivo* experiments (13). Actually, the phosphonylation rate of both VX enantiomers is higher than $10^6\ M^{-1} \cdot min^{-1}$ for both enzymes, so that the incubation time over 30 min was too long to discriminate their behavior. However, *in vivo* experiment shows that administration of hAChE gives a better survival rate of VX-exposed mouse (13).

Regarding the stereoselectivity of cholinesterases for G-agents tabun and soman, it has been established that human BChE and human AChE share the same selectivity (24, 29). Regarding sarin, bovine AChE reacts more than 4×10^3-fold faster with $sarin_S$-(−), the isopropyloxy substituent being too bulky for the AChE acyl-binding pocket, whereas the enantiomers inhibit horse serum BChE with virtually equal rates (30). Indeed, the structural data presented here and elsewhere show that the acyl-binding pocket of BChE can accommodate quite large substituents like isobutyloxy (VR) or diethylamino (TA1) (25). Moreover, mass spectrometry shows that the sarin-BChE conjugate does age by dealkylation, albeit partially (10). Aging by dealkylation suggests that the isopropyloxy substituent points toward His-438, *i.e.* the absolute configuration of the adduct is *R*, which in turn means that the enzyme reacted with $sarin_S$-(−). Incomplete aging could results either from insufficient reaction time or a significant portion of the enzyme inhibited by $sarin_R$-(+). In the latter case, both the kinetic experiment with horse serum BChE and the mass spectrometry analysis with human BChE show that these enzymes are not sufficiently enantioselective for sarin by contrast to AChE. This remains to be eventually supplemented by a structural study.

REFERENCES

1. Holmstedt, B. (1959) *Pharmacol. Rev.* **11,** 567–688
2. Silman, I., and Sussman, J. L. (2005) *Curr. Opin. Pharmacol.* **5,** 293–302
3. Li, B., Stribley, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S. H., and Lockridge, O. (2000) *J. Neurochem.* **75,** 1320–1331
4. Saxena, A., Sun, W., Luo, C., Myers, T. M., Koplovitz, I., Lenz, D. E., and Doctor, B. P. (2006) *J. Mol. Neurosci.* **30,** 145–148
5. Masson, P., and Lockridge, O. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.* **494,** 107–120
6. Lenz, D. E., Maxwell, D. M., Koplovitz, I., Clark, C. R., Capacio, B. R., Cerasoli, D. M., Federko, J. M., Luo, C., Saxena, A., Doctor, B. P., and Olson, C. (2005) *Chem. Biol. Interact.* **157–158,** 205–210
7. Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Benschop, H. P., De Jong, L. P., Ariel, N., Barak, R., Segall, Y., Velan, B., and Shafferman, A. (1999) *Biochemistry* **38,** 3055–3066
8. Masson, P., Nachon, F., and Lockridge, O. (2010) *Chem. Biol. Interact.* **187,** 157–162
9. Aurbek, N., Thiermann, H., Eyer, F., Eyer, P., and Worek, F. (2009) *Toxicology* **259,** 133–139
10. Li, H., Schopfer, L. M., Nachon, F., Froment, M. T., Masson, P., and Lockridge, O. (2007) *Toxicol. Sci.* **100,** 136–145
11. Millard, C. B., Koellner, G., Ordentlich, A., Shafferman, A., Silman, I., and Sussman, J. L. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121,** 9883–9884
12. Reiter, G., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., and Worek, F. (2008) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **873,** 86–94
13. Cohen, O., Kronman, C., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, A., and Shafferman, A. (2006) *Mol. Pharmacol.* **70,** 1121–1131
14. Kasten, S. A., Kajih, T., Smith, J. R., Oliver, Z., Otto, T. C., Reeves, T. E., Lenz, D. E., and Cerasoli, D. M. (2010) in *Proceedings of the 2010 Medical Defense Bioscience Review*, Hunt Valley, MD, May 24–27, 2010, p. 46, U.S. Army Medical Research and Development Command, Washington, DC
15. Hall, C. R., Inch, T. D., Inns, R. H., Muir, A. W., Sellers, D. J., and Smith, A. P. (1977) *J. Pharm. Pharmacol.* **29,** 574–576
16. Nachon, F., Nicolet, Y., Viguié, N., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Lockridge, O. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269,** 630–637
17. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., and Feather-Stone, R. M. (1961) *Biochem. Pharmacol.* **7,** 88–95
18. Kabsch, W. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 125–132
19. Collaborative Computational Project 4 (1994) *Acta Crystallogr. D Biol.*

Downloaded from www.jbc.org at University of Louisville, on July 5, 2011

Crystallogr. **50,** 760–763
20. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53,** 240–255
21. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60,** 2126–2132
22. Painter, J., and Merritt, E. A. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62,** 439–450
23. Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. (2002) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58,** 1948–1954
24. Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Nachon, F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 41141–41147
25. Carletti, E., Aurbek, N., Gillon, E., Loiodice, M., Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C., Masson, P., Thiermann, H., Nachon, F., and Worek, F. (2009) *Biochem. J.* **421,** 97–106
26. Nachon, F., Carletti, E., Wandhammer, M., Nicolet, Y., Schopfer, L. M., Masson, P., and Lockridge, O. (2011) *Biochem. J.* **434,** 73–82
27. Nachon, F., Carletti, E., Worek, F., and Masson, P. (2010) *Chem. Biol. Interact.* **187,** 44–48
28. Masson, P., Legrand, P., Bartels, C. F., Froment, M. T., Schopfer, L. M., and Lockridge, O. (1997) *Biochemistry* **36,** 2266–2277
29. Carletti, E., Colletier, J. P., Dupeux, F., Trovaslet, M., Masson, P., and Nachon, F. (2010) *J. Med. Chem.* **53,** 4002–4008
30. Boter, H. L., and van Dijk, C. (1969) *Biochem. Pharmacol.* **18,** 2403–2407
31. Diederichs, K., and Karplus, P. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4,** 269–275

Downloaded from www.jbc.org at University Of Maryland, On July 5, 2011

2. Inhibition du mutant G117H de la BChE par le VX

Comme il a été développé dans le chapitre 1, le mutant G117H de la BChE humaine possède des propriétés de bioépurateur catalytique, c'est-à-dire qu'il est capable d'hydrolyser les composés OP fixés dans son site actif. Suite aux résultats obtenus pour l'inhibition de la BChE inhibée par les agents V, s'est posée la question de la stéréosélectivité du mutant G117H. Si le mutant G117H n'hydrolyse que l'énantiomère le moins toxique pour l'hAChE, l'intérêt de ce mutant s'en trouve fortement diminué. Par ailleurs, une étude cristallographique de ce mutant permettait aussi de comprendre les mécanismes impliqués dans sa réactivation spontanée lors de l'inhibition par des OP et ainsi, de donner des solutions pour améliorer ses propriétés catalytiques.

Notre travail a permis de résoudre la structure cristallographique du mutant G117H de la BChE inhibée par des OP (échothiophate et VX). Nous avons mis en évidence que l'adduit formé entre la sérine catalytique du mutant G117H de BChE et le VX est identique à celui formé dans la BChE sauvage, c'est-à-dire que le groupement éthoxyle se retrouve logé dans la poche de fixation de l'acyle. On obtient donc l'adduit de configuration P_S, probablement issu de la réaction entre la sérine catalytique et l'énantiomère P_R du VX , le moins toxique pour l'hAChE.

Publication 2 *:* Nachon *et al*., 2011, Biochemical Journal, Vol. 434, pages 73-82

« X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in the G117H mutant of human butyrylcholinesterase, a nerve agent target engineered into a catalytic bioscavenger »

BJ www.biochemj.org

This is a data-enriched, interactive PDF that provides the gateway to a world of information when opened in Utopia Documents
Download FREE software now

BJ Structure

Biochem. J. (2011) **434**, 73–82 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20101648

X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in the G117H mutant of human butyrylcholinesterase, a nerve agent target engineered into a catalytic bioscavenger

Florian NACHON*[1], Eugenie CARLETTI*, Marielle WANDHAMMER*, Yvain NICOLET†, Lawrence M. SCHOPFER‡, Patrick MASSON*‡ and Oksana LOCKRIDGE‡

*Cellule Enzymologie, Département de Toxicologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées — CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France, †Laboratoire de Cristallogenèse et Cristallographie des Protéines, Institut de Biologie Structurale (CEA-CNRS-UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France, and ‡Eppley Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5950, U.S.A.

OPs (organophosphylates) exert their acute toxicity through inhibition of acetylcholinesterase, by phosphylation of the catalytic serine residue. Engineering of human butyrylcholinesterase, by substitution of a histidine residue for the glycine residue at position 117, led to the creation of OP hydrolase activity. However, the lack of structural information and poor understanding of the hydrolytic mechanism of the G117H mutant has hampered further improvements in the catalytic activity. We have solved the crystallographic structure of the G117H mutant with a variety of ligands in its active site. A sulfate anion bound to the active site suggested the positioning for an OP prior to phosphylation. A fluoride anion was found in the active site when NaF was added to the crystallization buffer. In the fluoride complex, the imidazole ring from the His^{117} residue was substantially shifted, adopting a relaxed conformation probably close to that of the unliganded mutant enzyme. Additional X-ray structures were obtained from the transient covalent adducts formed upon reaction of the G117H mutant with the OPs echothiophate and VX [ethyl ({2-[bis-(propan-2-yl)amino]ethyl}sulfanyl](methyl)phosphinate]. The position of the His^{117} residue shifted in response to the introduction of these adducts, overlaying the phosphylserine residue. These structural data suggest that the dephosphylation mechanism involves either a substantial conformational change of the His^{117} residue or an adjacent nucleophilic substitution by water.

Key words: acetylcholinesterase, bioscavenger, butyrylcholinesterase, organophosphorus, protein engineering, spontaneous reactivation.

INTRODUCTION

Recent progress in the understanding of enzyme catalysis, through the use of structural biology and molecular modelling, has opened a new era in protein engineering. It is now possible to develop rational strategies for modifying enzymes to confer upon them the ability to catalyse reactions for which they were not originally designed [1]. Human butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is an enzyme for which modifying its catalytic activity has been an ongoing subject of interest. This enzyme is related to acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), the enzyme that terminates the action of the neurotransmitter acetylcholine at postsynaptic membranes and neuromuscular junctions. BChE differs from AChE by its substrate specificity and inhibitor sensitivity [2,3]. Although BChE is present in numerous vertebrate tissues, its physiological role remains unclear [4].

Considerable interest has been shown in BChE because it hydrolyses a wide range of toxic esters, including heroin and cocaine, and because it scavenges toxic OP (organophosphylate) pesticides and nerve agents [5–7]. A lot of effort has been expended to improve its ability to hydrolyse these compounds. Redesign of its active site has improved its cocaine hydrolase activity 2000-fold, turning it into a very efficient cocaine detoxifying tool [8]. This redesign was based on hybrid QM/MM (quantum mechanical/molecular mechanical) studies aimed at finding ways to stabilize the acylation transition state of the cocaine hydrolysis reaction.

Reaction of cholinesterases with OP compounds is another area in which modification of the native cholinesterase activity has received considerable attention. This is a consequence of the irreversible inhibition of AChE (at the neuronal synapses and neuromuscular junctions) by OP compounds which leads to accumulation of acetylcholine and results in paralysis, seizures and other symptoms of cholinergic syndrome. Under extreme conditions, inhibition of AChE can lead to death [9]. Native plasma BChE works well as a stoichiometric bioscavenger because it reacts very efficiently with OP compounds, trapping them in a 1:1 complex in the bloodstream before they can reach synaptic AChE. Injection of wild-type BChE, intravenously or intramuscularly, protects animals against three to five LD_{50} of the nerve agents soman [2-(fluoromethylphosphoryl)oxy-3,3-dimethylbutane], VX [ethyl ({2-[bis(propan-2-yl)amino]ethyl}-sulfanyl)(methyl)phosphinate] and tabun ethyl (*N*,*N*-dimethylphosphoramidocyanidate) [10]. BChE purified from human plasma (Baxter Healthcare) or produced in the milk of transgenic goats [11] has successfully completed clinical trials and is about to reach the market as a bioscavenger for pre-treatment against OP intoxication. A BChE dose up to 250 mg/70 kg of body weight is required to achieve efficient protection of humans following a challenge with one LD_{50}

Abbreviations used: AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase; CHO, Chinese-hamster ovary; DEP, diethoxyphosphoryl; OP, organophosphylate; QM/MM, quantum mechanical/molecular mechanical; RMSD, root mean square deviation; TLS, translation libration screw-motion '.

[1] To whom correspondence should be addressed (email florian@nachon.net).

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

Biochemical Journal

of OPs [12]. Thus a large amount of enzyme is necessary to achieve an efficient protection. This is due to the stoichiometric and irreversible nature of the reaction between the OP and BChE, and to the unfavourable OP/BChE mass ratio. Such large doses are expensive, and will prevent the widespread use of wild-type BChE as a pre-treatment. Research efforts are now devoted to circumventing this limitation by developing catalytic bioscavengers able to hydrolyse OPs [13].

Very early in the study of OP inhibition of cholinesterases, it was suggested that OP inhibitors could be considered as hemisubstrates of cholinesterases because formation of the enzyme–inhibitor complex was efficient but the dephosphylation was not. Slow dephosphylation was presumed to be a consequence of there being no amino acid groups at the appropriate positions to catalyse hydrolysis by in-line nucleophilic attack of water [14]. The idea of introducing a residue that was capable of catalysing the dephosphylation step into the active site came after. In principle, after such a modification, OPs would become full substrates for the modified cholinesterase, or, in other words, the added residue would turn the cholinesterase into an OP-hydrolase, i.e. a catalytic bioscavenger [15].

This approach proved to be qualitatively successful. BChE was shown to gain OP hydrolase activity when a histidine residue was substituted for the glycine residue at position 117 [16,17]. The G117H mutant is remarkably efficient at hydrolysing echothiophate, having a catalytic rate constant, k_{cat} of 0.75 min^{-1} in 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0, at 25 °C. The G117H mutant can also hydrolyse the nerve agents sarin, VX and, additionally, soman if a second mutation (E197Q) is introduced to prevent fast aging of the conjugate [18]. Dephosphylation remains the rate-limiting step with k_{cat} of 5.2×10^{-3} min^{-1} for sarin, 7.2×10^{-3} min^{-1} for VX and 77.0×10^{-3} min^{-1} for the most toxic isomer of soman (P_SC_S) (0.067 M phosphate buffer, pH 7.5, at 25 °C). Furthermore, it has been shown that transgenic mice expressing the G117H mutant are resistant to OP [19]. Although the G117H/E197Q mutant is generally considered to reactivate too slowly to be of general use as a catalytic bioscavenger for nerve agents, it provides an improvement over the native enzyme. Spontaneous reactivation of soman-, sarin- or VX-inhibited G117H/E197Q replenishes half of the affected enzyme in approx. 10 min [18]. This could be lifesaving in a scenario where successive exposures to these OPs occur.

To date, more than 60 BChE mutants have been made in an effort to improve the OP hydrolase activity of the original G117H mutant. It was found that G117D, G117E, L286H and several G117H-based double and triple mutants were capable of hydrolysing echothiophate [20]. However, the G117H mutant remains the most efficient by at least two orders of magnitude. One reason for this relative failure to find an improved mutant is that the dephosphylation mechanism is poorly understood. Knowledge of the structure of the active site of the G117H mutant now appears to be critical in order to understand the catalytic mechanism and to design more efficient G117H-based mutants. An indication of the pressing need for an experimentally determined structure of the active site of the G117H mutant is provided by two recent publications [21,22] in which the three-dimensional structure of the G117H BChE mutant was determined computationally. Although they are interesting, such models cannot replace an experimental structure.

In the present paper we provide the X-ray structure of the G117H mutant, the structures of the transient covalent adducts formed upon reaction of the G117H mutant with echothiophate and VX (Figure 1), and the structure of a fluoride complex that was the consequence of an attempt to create a transition-state phosphate analogue in the form of MgF_3^-. These crystal structures give a true picture of the active site of the G117H mutant under a variety of conditions and provide the essential information needed to perform QM/MM studies aimed at designing mutants with improved hydrolytic capabilities.

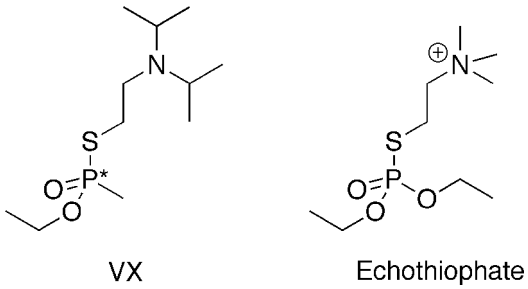


Figure 1 Chemical structures of VX and echothiophate

The asterisk (*) denotes a chiral centre.

EXPERIMENTAL

Materials

VX was obtained from the Centre DGA Maîtrise NRBC (Vert-le-Petit, France). VX is highly toxic. It belongs to schedule 1 chemicals as defined in the Chemical Weapons Convention. All work with VX is regulated by that Convention. Echothiophate [*O*-diethyl-*S*-(2-trimethylammonium ethyl)] phosphorothioate, was obtained from Biobasal. The handling of VX and echothiophate is dangerous and requires suitable personal protection, training and facilities.

Production of the recombinant G117H mutant of human BChE, purification and crystallization

The crystallizable low-glycosylated monomeric form of human BChE was mutated into the G117H [16], produced in CHO (Chinese-hamster ovary) cells and purified under conditions similar to those described for the wild-type enzyme [23]. Crystals of the G117H mutant were prepared in five ways. First, crystals of the G117H mutant were grown in an ammonium sulfate containing mother liquor as previously reported, using the hanging-drop vapour-diffusion method, at room temperature [23]. Secondly, crystals were grown in the mother liquor plus 5 mM $MgCl_2$ and 10 mM NaF as additives. The purpose of this crystallization condition was to generate crystals wherein MgF_3^- would appear as a mimic for PO_3^- in the active site of the G117H mutant. Thirdly, crystals were grown in the presence of 5 mM $Al(NO_3)_3^-$ and 10 mM NaF with the purpose of generating crystals with AlF_4^- in the active site, again as a mimic for PO_3^-. Fourthly and fifthly, crystals of the VX–G117H and echothiophate–G117H phosphylated enzyme transient adducts were prepared by flash-soaking the G117H mutant crystals for 2 min in 0.1 M Mes buffer, pH 6.5, 6 % glycerol and 2.1 M ammonium sulfate containing either 1 mM VX or 1 mM echothiophate. The crystals were then washed with a cryoprotectant solution (0.1 M Mes buffer, pH 6.5, with 2.1 M ammonium sulfate, containing 20 % glycerol) and flash-cooled in liquid nitrogen. At this stage, the VX–adduct in the crystals of VX–G117H BChE presents absolutely no danger.

X-ray data collection and structure solution

Diffraction data for the G117H mutant (i) without additives, (ii) with $MgCl_2$ and NaF, (iii) with $Al(NO_3)_3^-$ and NaF, or (iv) after formation of the echothiophate–G117H adduct were

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

Table 1 Data collection and refinement statistics

R-factor = Σ |F_o − |F_c / Σ |F_o|, F_o and F_c are observed and calculated structure factors. The *R*-free set uses approx. 1000 randomly chosen reflections.

Parameter	Value			
Ligand	Sulfate	Fluoride	Echothiophate	VX
PDB code	2XMB	2XMC	2XMD	2XMG
Data collection				
ESRF beamline	ID14-2	ID14-1	ID14-2	ID23-2
Space group	*I*422	*I*422	*I*422	*I*422
Unit cell axes, $a = b$, c (Å)	154.8, 134.6	155.6, 128.0	154.9, 127.5	156.6, 128.4
No. of measured reflections	308251	154794	249541	166904
Unique reflections	47525	29897	33216	20940
Resolution (Å)	37.6−2.1 (2.4−2.1)	41.1−2.4 (2.5−2.4)	28.1−2.3 (2.4−2.3)	55.5−2.7 (2.8−2.7)
Completeness (%)	99.5 (99.0)	96.7 (96.2)	95.9 (85.4)	94.3 (95.0)
R_{sym} (%)	6.1 (36.4)	5.6 (51.0)	4.9 (23.9)	7.1 (56.0)
I/σ(I)	21.3 (5.7)	28.0 (3.6)	28.9 (6.0)	23.7 (3.8)
Redundancy	6.4 (6.5)	5.1 (4.9)	7.5 (4.5)	8.0 (7.4)
Refinement statistics				
R-factor (*R*-free)	16.8 (20.8)	19.2 (25.2)	17.0 (21.4)	17.6 (25.0)
No. of atoms				
Protein	4209	4216	4226	4226
Solvent	380	229	285	151
Others	189	171	198	168
B-factor (Å^2)	41.7	46.08	40.08	56.14
RMSD from ideality				
Bond length (Å)	0.024	0.021	0.023	0.018
Angles (deg)	2.182	2.009	2.090	1.933
Chiral (Å^3)	0.154	0.140	0.157	0.128

collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France), on the ID14-2 beamline using a wavelength of 0.933 Å (1 Å = 0.1 nm) and an ADSC Quantum 4 detector. Diffraction data for the VX−G117H adduct were collected at the ESRF on the ID23-2 beamline using a wavelength of 0.873 Å and a MAR-Research charge-coupled detector. All datasets were processed with XDS (http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/) [24]. The structures were solved using the CCP4 suite (http://www.ccp4.ac.uk/) [25]. An initial model was determined by molecular replacement with MolRep [26], starting with the recombinant BChE structure (PDB code 1P0I) from which all ligands and glycan chains were removed. For all diffraction datasets, the model was refined as follows. An initial rigid-body refinement was made with REFMAC5 [27], which was followed by iterative cycles of model building with Coot [28]. Finally, restrained and TLS (translation libration screw-motion) refinements were carried out with REFMAC5. The bound ligands and their descriptions were built using the Dundee PRODRG2.5 server (http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/), including energy minimization using GROMOS96.1 force field. Significant falls in *R*-factor and *R*-free occurred during the TLS refinement. TLS groups were defined with the help of the TLS Motion Determination server (http://skuld.bmsc.washington.edu/~tlsmd/index.html) [29]. The refined TLS parameters are included in the deposited PDB file for each entry. SA-composite omit maps were calculated using Phenix (http://www.phenix-online.org/) [30] in order to check for any bias in the model. Protein structures were displayed using the program PyMOL (DeLano Scientific; http://www.pymol.org).

RESULTS

Crystallographic structure of the G117H mutant without additives

Crystals were grown in the absence of any extra additives, using ammonium sulfate as a precipitant. Data were collected from tetragonal crystals of space group *I*422 and refined to 2.1 Å. The space group is identical with that formed by the wild-type enzyme. Data and refinement statistics are summarized in Table 1. The mutation does not induce any noticeable conformational change in the enzyme as shown by the marginal all-atoms RMSD (root mean square deviation) of 0.205 Å between G117H BChE and the wild-type BChE (PDB code 1P0I). In particular, the main-chain atoms of the Gly^{117} residue in the wild-type enzyme and the His^{117} residue in the mutant enzyme superimpose very well (RMSD = 0.225 Å).

Unexpectedly, there is a sulfate ion bound in the active site, opportunely mimicking an OP about to be attacked by the catalytic serine residue (Figure 2A). The sulfur atom of the sulfate ion is 2.8 Å from Ser^{198}−Oγ; the O1 and S atoms of SO_4^{2-} and the Ser^{198}−Oγ atom are colinear (175°); the distance between the O1 and Ser^{198}−Oγ atoms is 4.3 Å which favourably compares with the distance between the oxygens located at the apical vertices of a trigonal–bipyramidal phosphorus transition state (4.1 Å). However, the $2F_o$–F_c map does not reveal any continuity of electron density between the S and Ser^{198}−Oγ atoms. Such continuity would have suggested a covalent bond between these atoms. The O4 atom of the SO_4^{2-} is well stabilized in the oxyanion hole, being at hydrogen-bonding distance from the main-chain nitrogens of the Ala^{199}, Gly^{116} and His^{117} residues (2.9, 3.0 and 2.9 Å respectively). O3 is stabilized by a strong hydrogen bond with Ser^{198}−Oγ (2.6 Å) and a salt bridge with the His^{117}−Nδ1 atom (2.5 Å). A salt bridge between the O2 and the His^{438}−Nε2 atoms (2.6 Å) further stabilizes the sulfate ion. The His^{117} residue adopts a conformation that is not standard (c1 = −116°, c2 = 44°) according to the penultimate rotamer library [31]. This adjustment probably results from the interaction of the His^{117}−Nε2 atom with the main-chain carbonyl oxygen of the Leu^{286} residue (2.8 Å), and from a salt bridge between the His^{117}−Nδ1 atom and the O3 atom of the sulfate (2.5 Å). This conformation is probably not representative of that adopted by the His^{117} residue in the absence of the sulfate ion, although it

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

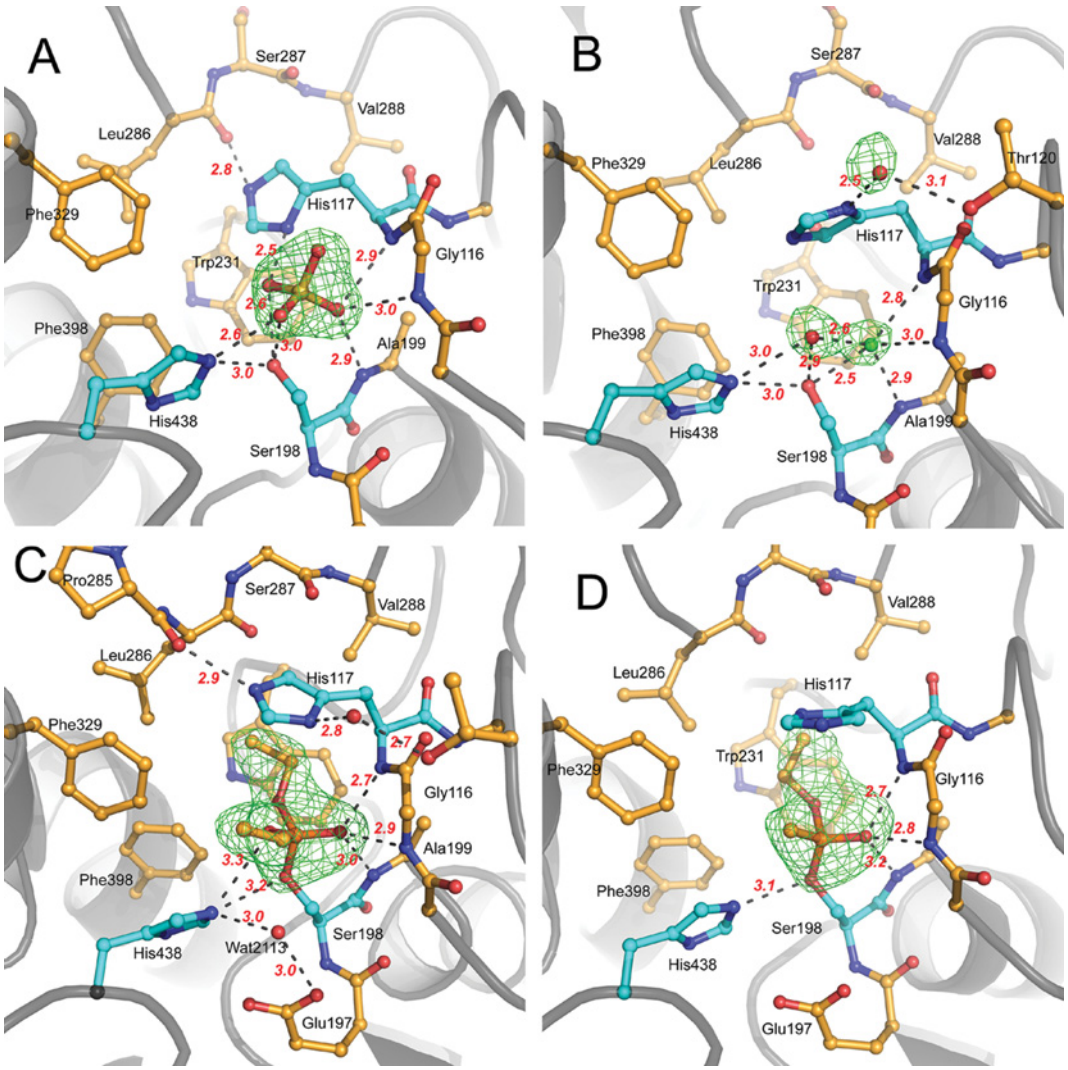


Figure 2 The active site of G117H BChE

(**A**) in the presence of sulfate, (**B**) in the presence of fluoride, (**C**) with diethylphosphate covalently attached to the Ser[198] residue, i.e. an echothiophate adduct and (**D**) with *O*-ethyl-methylphosphonate attached to the Ser[198] residue, i.e. a VX adduct. Active site residues are shown in the ball-and-sticks format. Carbon atoms are shown in bright orange (or cyan for key residues), nitrogen atoms in deep blue, the phosphorus atom in orange and oxygen atoms in red. Hydrogen bonds are represented by dashes. The electron density *Fo*-*Fc* omit map is represented by a green mesh contoured at 3σ.

could indicate the conformation in the OP complex just prior to phosphorylation of the Ser[198] residue.

As is often observed in the crystal structures of wild-type BChE [32–35], there is an unidentified ligand stacked against Trp[82] that we chose to model with dummy atoms. This ligand is at hydrogen-bonding distance from the O2 atom of SO_4^{2-} (2.9 Å). In addition, the O1 atom is at hydrogen-bonding distance (2.5–3.0 Å) from another unidentified ligand, the electron density of which stretches between the Gln[119], His[117] and Thr[120] residues. This density was also modelled by dummy atoms.

Crystallographic structure of the G117H mutant in complex with fluoride

Data were collected from tetragonal crystals grown in the presence of $MgCl_2$ and NaF. The original rationale for using these additives was to trap a transition-state analogue in which MgF_3^- would mimic PO_3^- [36]. This structure was refined to 2.4 Å resolution (see the details in Table 1).

There are two peaks of electron density in the F_o–F_c omit maps (green mesh, 4.5 σ). Both are present at the heart of a dense hydrogen-bond network involving the oxyanion hole, the catalytic serine residue (Ser[198]) and the catalytic histidine residue (His[438]) (Figure 2B). One peak probably corresponds to a water molecule which forms one edge of a triangular hydrogen-bond network involving the Ser[198]–Oγ and His[438]–Nε2 atoms. The second peak corresponds to an atom that strongly interacts with both the water molecule (2.6 Å) and the Ser[198]–Oγ (2.5 Å) atom, and is at hydrogen-bonding distance from the three main-chain nitrogens of the oxyanion hole residues (Gly[116], 3.0 Å; His[117], 2.8 Å; and Ala[199], 2.9 Å). As the molecule represented by this density was able to displace the sulfate ion that was observed in the absence of NaF, and because there is a three-pronged interaction with the oxyanion hole as expected for a fluoride anion, we modelled this density as a putative fluoride ion.

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

This interpretation is supported by the fact that the fluoride anion is known to be a reversible inhibitor of BChE [37–39]. Although binding sites have not been identified yet, it has been reported that fluoride competes with OPs and it has been proposed that the binding involves two or more hydrogen donors necessary for enzyme catalysis [40]. Alternatively, a water molecule has been observed in a position similar to that of this putative fluoride ion for some BChE structures [41]. However, the interaction of that water with the oxyanion hole was clearly weaker, based on the distance of hydrogen donors, suggesting a two-pronged hydrogen-bond interaction.

Although the general conformation of the His^{117} residue in this structure is well resolved, the orientation of the imidazole ring is not. This is because there are two peaks of electron density in the F_o–F_c maps, one on each side of the imidazole ring, suggesting alternative interactions of the His^{117}–Nδ1 atom with two water molecules at relatively low occupancy. In the first option, the c1 and c2 angles of the His^{117} residue are $-48°$ and $103°$ respectively (this is the structure shown in Figure 1B). The water molecule (peak at 4.1 σ) is at hydrogen-bonding distance from the backbone nitrogen of the Thr^{120} residue (3.1 Å), and interacts strongly with the His^{117}–Nδ1 atom (2.5 Å). In the alternative refined model (position not shown in Figure 2B), the ring is simply flipped with c1 = $-46°$ and c2 = $-71°$. The water molecule (peak at 3.5 σ) is at hydrogen-bonding distance from the carbonyl oxygen of the Leu^{286} residue (3.1 Å), and interacts very strongly with the His^{117}–Nδ1 atom (2.4 Å). This conformation is reasonably close to the m $-70°$ histidine conformation from the penultimate rotamer library (c1 = $-65°$ and c2 = $-70°$) [31]. We favoured the first option for the final model of the His^{117} residue because it better modelled the strongest peak in the F_o–F_c map and because it kept both water molecules in the structure. The conformation of the His^{117} residue adopted in Figure 2(B) is probably representative of that found in the mutant structure in the absence of ligands.

Following the same logic we used for $MgCl_2$ and NaF as additives, we grew crystals in the presence of 5 mM $Al(NO_3)_3$ and 10 mM NaF. The idea was to trap an AlF_4^--based transition-state analogue of PO_3^- in the active site [42]. The crystal structure was refined to 2.4 Å resolution (results not shown). It yielded a crystal structure that was identical with that found when the crystals were grown in the presence of $MgCl_2$ and NaF. This confirmed that fluoride was the key additive leading to the observed complex.

Crystallographic structure of echothiophate–G117H transient adduct

Data were collected from a crystal that was flash-soaked for 2 min in a solution containing 1 mM echothiophate. We chose to prepare the crystal in this way because dephosphorylation is partly rate-limiting for the hydrolysis of echothiophate (1.2 min^{-1}) [17]. Therefore we assumed that the phosphoryl intermediate would likely accumulate in the crystal in the presence of excess echothiophate. The structure was refined to 2.3 Å (see details in Table 1).

A strong peak of positive electronic density (11.8 σ), within covalent-bonding distance of the catalytic serine residue was seen in the initial F_o–F_c map (Figure 1C). This is consistent with the presence of a bound DEP (diethoxyphosphoryl) moiety. The position of the DEP is similar to that which it adopts in wild-type BChE (PDB code 1XLW) [33]. The phosphorus atom is found at a covalent-bonding distance of 1.64 Å from the Ser^{198}–Oγ atom. The O3 atom, the phosphoryl oxygen, is at hydrogen-bonding distance from the main-chain amide nitrogens of the oxyanion hole residues with the shortest distance being to the His^{117}–N atom (2.7 Å). There is a very dense hydrogen-bond network involving the His^{438}–Nε2, Ser^{198}–Oγ, DEP–O2, Glu^{197}–Oε1 atoms and water molecule 2113. Given the interatomic distances and angles, the strongest hydrogen bonds are between the His^{438}–Nε2 atom and water molecule 2113; and the Glu^{197}–Oε1 atom and water molecule 2113 (both 3.0 Å).

The water molecule 2113 is in the same position as the water molecule 101 described in the DEP conjugate with native BChE (PDB code 1XLW). This water molecule promotes 'aging', i.e. dealkylation of the nearby ethoxy group, by attacking the DEP–C3 atom [33,43]. Aging via dealkylation was proven by mass spectral analysis of the product after aging in the presence of $H_2{}^{18}O$ [33,43].

Comparing the DEP–G117H mutant with wild-type DEP–BChE, it appears that the His^{117} residue side chain induces a concerted shift of DEP–C3 towards water molecule 2113 (by 1.2 Å) and water molecule 2113 towards the Trp^{82} residue (by 0.7 Å). As a consequence, the distance between DEP–C3 and water molecule 2113 is only 2.9 Å in the DEP–G117H mutant compared with 3.8 Å in wild-type DEP–BChE. Thus the imidazole of the His^{117} residue appears to be an obstacle to the formation of the phosphylated enzyme.

Given the preeminent role of water molecule 2113 in the dealkylation of DEP, it is expected that a shorter distance between DEP–C3 and water molecule 2113 would be more favourable for the aging reaction. This was experimentally verified. The dealkylation rate of the DEP–G117H mutant is about seven times higher than that for wild-type DEP–BChE under similar conditions [17].

The His^{117} residue also induces a slight rearrangement of the second ethoxy group of DEP and its environment. The imidazole ring prevents DEP–C2 from pointing toward the Val^{288} residue, and thus DEP–C2 is forced toward the Leu^{286} residue. In response, the Leu^{286}–Cδ1 and Leu^{286}–Cδ2 atoms shift away by approx. 1 Å. A similar rearrangement of the Leu^{286} residue was observed previously in an *N*-diethylphosphoramidyl conjugate of BChE [35].

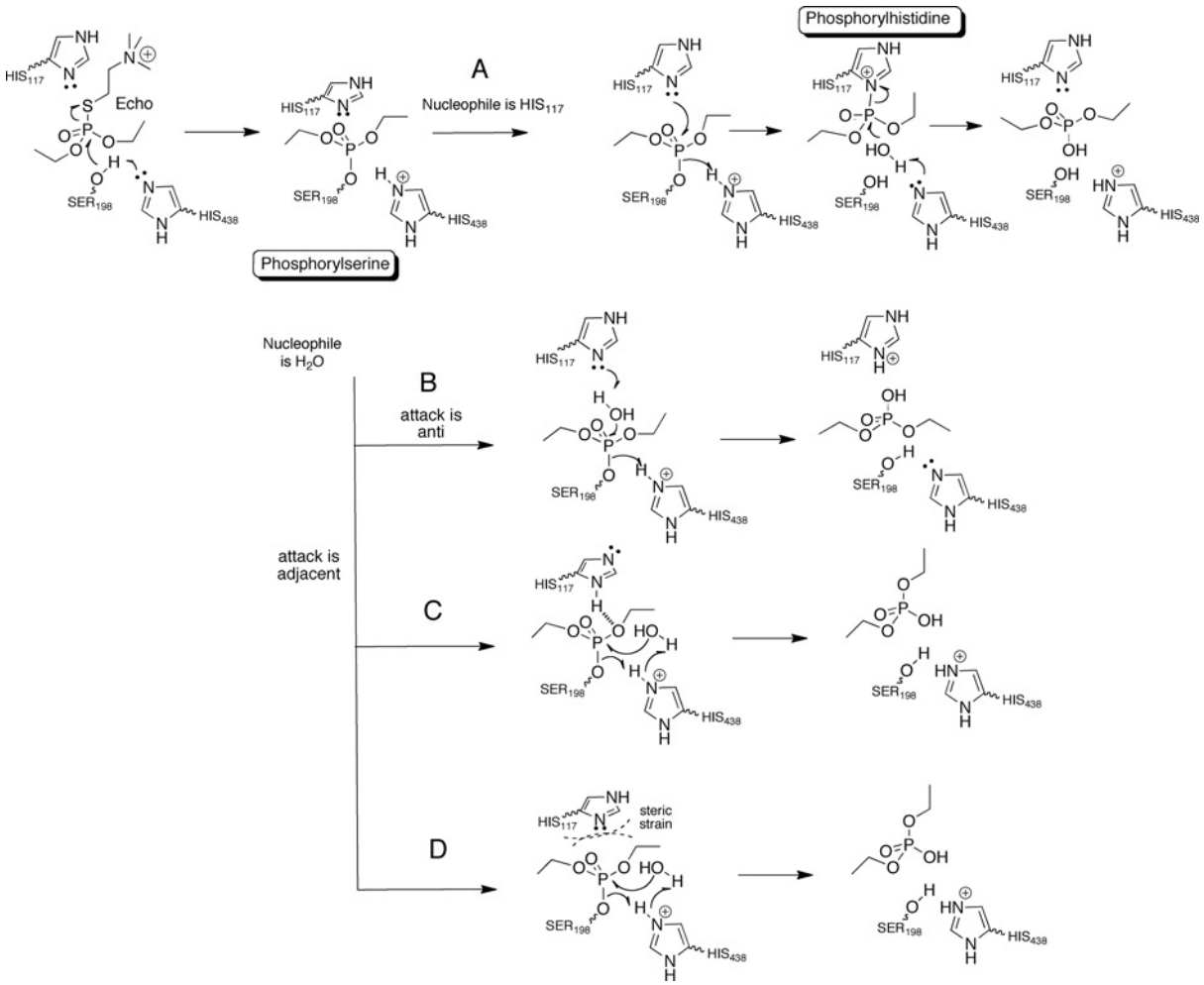
The His^{117} residue adopts a stable conformation (c1 = $-62°$; c2 = $-76°$) corresponding to m $-70°$ from the penultimate rotamer library. The imidazole ring is lying flat, above the DEP. This conformation is stabilized by a hydrogen bond between the His^{117}–Nε2 and the Pro^{285}–carbonyl–O atoms, and a hydrogen bond to a water molecule bridging the His^{117}–Nδ1, and Thr^{120}–Oγ1 atoms.

The distances between the His^{117} residue and the phosphorus of DEP provide some basis on which to address the mechanism of dephosphorylation for DEP–G117H. The His^{117}–Nδ1 atom is 4.6 Å from DEP–P and 3.9 Å from DEP–C3 (1.3 and 0.6 Å channel width respectively). These distances are too short to allow a water molecule to fit between the His^{117} residue and the phosphorus as depicted on Scheme 1 (pathway B, 'attack is anti'). For this path to be active, a conformation change of the His^{117} residue would have to occur. Alternatively, because the His^{117}–Nδ1, DEP–P and Ser^{198}–Oγ atoms are almost colinear (168°), a simple rotation of the imidazole ring by $-60°$ around the Cβ–Cγ atoms would place the Nδ1 atom of the His^{117} residue 3.7 Å from DEP–P with the nitrogen lone pair pointing toward the phosphorus atom. This situation seems plausible for a nucleophilic attack of the His^{117} residue on the phosphorus, i.e. the 'Nucleophile is His^{117}' path as depicted in Scheme 1 (pathway A).

Crystallographic structure of VX–G117H transient adduct

Data were collected from a crystal that was flash-soaked for 2 min in a solution containing 1 mM VX. The reasons for preparing

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society



Scheme 1 Potential mechanisms for the hydrolysis of echothiophate by the G117H mutant

The upper pathway (**A**) involves the nucleophilic attack by the His^{117} residue on the phosphorus of the adduct followed by the hydrolysis of the phosphylhistidine by a water molecule. The lower pathways involve a nucleophilic attack by a water molecule on the phosphorus of the adduct, either from a position anti (**B**) or adjacent (**C** and **D**) to the catalytic serine residue.

the crystal in this way are the same as those described in the 'Crystallographic structure of echothiophate–G117H transient adduct' section. As the dephosphonylation rate of VX–G117H is 200-fold lower than that of diethylphosphoryl–G117H, trapping the hydrolysis intermediate was expected to be less challenging. The structure was refined to 2.7 Å (see details in Table 1).

No water molecule equivalent to 2113 is present in the active site of the VX–adduct structure (Figure 2D). A peak of electron density more than 4 Å away from the His^{438} and Glu^{197} residues was modelled as an ammonium ion likely to be electrostatically interacting with the Glu^{197} residue and the π system of the Trp^{82} residue (results not shown).

A peak in the initial F_o–F_c map (3.7 σ) was found at a covalent-bonding distance from the Ser^{198}–Oγ atom (1.7 Å). The absolute configuration of the phosphorus atom is P(S). The methyl group is pointing towards the His^{438} residue (Figure 2D). The ethoxy group is located in the acyl-binding pocket defined by the Leu^{286}, Val^{288} and Trp^{231} residues. This orientation is the mirror image of that observed in VX–*Tc*AChE [44], but identical with that observed in VX–BChE (results not shown).

The ethoxy group points towards the Val^{288} residue and superimposes very well on the equivalent ethoxy in the wild-type DEP–BChE structure. However, this orientation is different from that just described for the DEP–G117H structure where the ethoxy group was pointing towards the Leu^{286} residue. As a consequence, the shift of the Leu^{286} residue that is observed in the DEP–G117H conjugate does not occur in the VX–G117H conjugate. Also, the carbonyl oxygen from the Pro^{285} residue is not available for interaction with the His^{117}–Nε2 atom. This is reflected in two conformations for the His^{117} residue that differ by the ring orientation, $c1 = -7°$ and $c2 = -124°$ or $c1 = -7°$ and $c2 = 57°$. These conformations are far from common histidine rotamers. This unusual conformational arrangement may be a consequence of the asymmetry of the adduct. That is, the His^{117} residue imidazole ring is shifted over the methyl substituent and away from the bulkier ethoxy. In this position, it cannot be stabilized by hydrogen-bonding because it is too far from the acceptors in the acyl-binding pocket, and too close to the Thr^{120} residue to let a bridging water molecule slip in. This translates into much higher residual *B*-factors for the imidazole ring atoms ($\approx$53 Å^3), in comparison with main-chain atoms ($\approx$38 Å^3). The corresponding *B*-factors are much smaller for the DEP–G117H adduct, where they are 16 Å^3 for the Ca atom and 10 Å^3 for the His^{117}–Nε2 atom. The large *B*-factors for the imidazole of

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

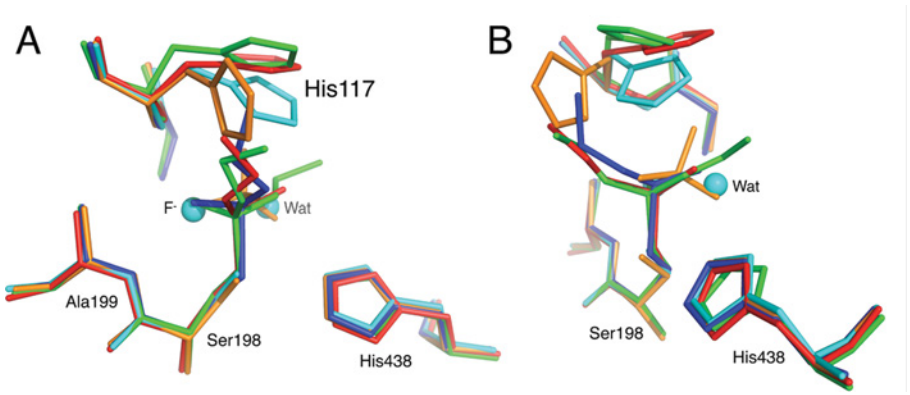


Figure 3 Two views of the active site of butyryl-BChE

The active site (blue; PDB code 1P0I) is superimposed on the G117H complex with sulfate (orange), fluoride (cyan), echothiophate (green) and VX (red). From the side (**A**) and front (**B**).

the His^{117} residue in the VX–G117H adduct do not permit the orientation of the imidazole ring to be determined with confidence.

Much like in the DEP–G117H structure, the His^{117}–Nδ1 atom is at 4.5 Å from DEP–P and 3.8 Å from DEP–C3. These short distances would not allow a water molecule to get between the phosphorus and the His^{117} residue in the absence of a large conformational change. The His^{117}–Nδ1, DEP–P and Ser^{198}–Oγ atoms are less colinear (157°) than in the DEP–G117H conjugate. Cβ for the His^{117} residue in the VX–G117H adduct is offset by 0.7 Å from its position in DEP–G117H adduct (Figure 3). Thus the maximum allowable side-chain rotation around Cβ–Cγ is −50°. That would partially orient the lone electron pair of the His^{117}–Nδ1 atom towards the adduct, but any further motion towards the phosphorus atom would lead to a clash between the His^{117}–Nδ1/Cε2 atoms and the methyl substituent of the VX. This situation is less favourable for a nucleophilic attack of the His^{117} residue on the phosphorus than was the case in the DEP–G117H intermediate.

DISCUSSION

Impact of mutations at position 117 on the activity of BChE and related enzymes

When BChE is mutated at position 117 it loses catalytic efficiency for the hydrolysis of thio- and oxo-esters [15,16]. It was hypothesized that this loss in activity was related to a change in the orientation of the His^{117} residue nitrogen proton donor of the oxyanion hole, leading to weaker transition state stabilization owing to suboptimal hydrogen-bonding [45]. We observe no such change in the X-ray structures of G117H presented in the present paper (Figure 3). Although there is some heterogeneity in the positions adopted by His^{117}, depending on the adduct, the positions of the critical oxyanion hole residues are unchanged.

Alternatively, loss of activity towards the normal thio- oxo-esters may be due to the imidazole ring of the His^{117} residue blocking the approach of substrate and water. This suggestion is based on the fluoride–G117H structure, which we take to be representative of the unliganded resting enzyme. In this structure, the His^{117} residue clutters access to the oxyanion hole (Figure 3B), and is very likely to be a steric obstruction to the formation of all substrate complexes, including the transition state. A change in the position of the His^{117} residue would be necessary in order to properly orient a substrate in the oxyanion hole, but even then optimal orientation may not be achieved.

Such a conformational change is seen in the sulfate complex. If the His^{117} residue were to maintain the position observed in the fluoride complex, it would collide with the sulfate oxygen that is opposite the serine. Consequently, the histidine residue is forced sideways in the sulfate complex.

Similarly, proper fitting of an OP into the active site of BChE requires a conformational change of the His^{117} residue (compare Figure 2A with Figures 2C and 2D). Such steric hindrance from the His^{117} residue could explain the two-to-four-orders of magnitude decrease in phosphylation rates observed for OPs reacting with G117H [46].

Loss of sensitivity to OP inhibitors in insects may be attributed to the same phenomenon. For example, a natural mutation in mosquito acetylcholinesterase G119S, a position equivalent of Gly^{117} in BChE, is at the origin of their resistance to OP pesticides [47]. No OP-hydrolase activity was reported for this mutant, but resistance could arise from decreased affinity for OP. It is noteworthy of mention that no OP-hydrolase activity was observed for the equivalent BChE mutant, G117S [20]. A second example is the G137D mutant of carboxylesterase from sheep blowfly [48]. Position 137 is equivalent to position 117 in BChE and substitution an aspartate residue for the glycine residue at this position would be expected to hinder access to the oxyanion hole. The G137D mutation reduces sensitivity to OPs and confers OP-hydrolase activity on the carboxylesterase. OP-hydrolase activity was also found for the equivalent G117D mutation in BChE [20]. Finally, a triple mutation in *Bungarus fasciatus* AChE aimed at introducing a histidine into a position homologous with position 117 of BChE reduces sensitivity to OPs and turns this enzyme into an OP hydrolase [49].

Candidate mechanisms for catalytic dephosphylation

Four different mechanisms have been proposed by previous investigators to explain why dephosphylation of G117H BChE is faster than dephosphylation of the native enzyme (Scheme 1).

Mechanism A

The first mechanism is based on a nucleophilic attack of the His^{117} residue on the phosphorus, leading to a phosphylhistidine intermediate that is subsequently hydrolysed (Scheme 1, pathway A, the 'Nucleophile is His^{117}'). This mechanism was originally proposed by Fortier and colleagues on the basis of molecular mechanics calculations [50].

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

One argument against this mechanism is that phosphohistidines have a high-energy phosphoramidate bond and tend to transfer the phosphoryl group to other molecules [51,52]. Thus it would be expected that a phosphylhistidine would transfer its phosphyl moiety to the serine residue and not the other way around. Following this reasoning, early investigators proposed that the OP–serine adduct was formed via an intermediate OP–histidine donor rather than through a direct phosphylation by the OP [53].

Support for nucleophilic attack by the His^{117} residue on the phosphorus comes from the colinearity of the $His^{117}-N\delta1$, the phosphorus and $Ser^{198}-O\gamma$ atoms in the DEP–G117H conjugate, and to a lesser extent in the VX–G117H conjugate. A 60° rotation of the imidazole ring around the $C\beta-C\gamma$ bond would orient the lone pair of electrons on the nitrogen toward the phosphorus for direct nucleophilic attack. Unfortunately, the phosphorus substituents are in close contact with the imidazole ring and these interactions would prevent a simple rotation around $C\beta-C\gamma$ bond. Rotation could occur only if the His^{117} residue moved back from the phosphorus substantially. Even if the simple rotation were to occur, the imidazole would still be 3.7 Å from the phosphorus, too far for covalent interaction. Taken together, the crystal data and the thermodynamics argue that pathway A is unlikely. Proof for this mechanism would require trapping of the phosphylhistidine intermediate.

Mechanism B

The second mechanism is a nucleophilic attack by water on the phosphorus atom, promoted by the His^{117} residue. The oxygen of the attacking water would have to be positioned opposite the serine–phosphorus bond, i.e. in an apical or 'anti' position (Scheme 1, pathway B, 'attack is anti'). This mechanism formed the basis of the original rationale for the design of the G117H mutant [54]. Broomfield et al. [54] reasoned that "it might be possible to introduce a second nucleophilic centre into the active site in such a position that it could carry an activated water molecule to the face of the phosphorus moiety opposite the phosphorus–serine bond and thereby reactivate the enzyme". Newcomb et al. [48] extended this mechanism to the G137D mutant of the sheep blowfly carboxylesterase, the aspartate residue acting as a base to orient a water molecule in the appropriate position for hydrolysis. By analogy, this mechanism was also proposed for the G117D, G117E and L286H BChE mutants [20]. Finally, this mechanism was recently re-proposed by Amitay and Shurki [21] based on similarities with RNase A. The active site of RNase A contains two histidine residues, His^{12} and His^{119}, in locations comparable with those of the His^{117} and His^{438} residues of BChE. The His^{12} residue serves as a base to abstract a proton from the 2′-oxygen of the RNA substrate molecule, thereby activating it for attack on the phosphorus. The His^{119} residue serves as an acid to protonate the oxygen of the leaving group [55].

The X-ray structures in Figures 2(C) and 2(D) show that the imidazole of the His^{117} residue is in close contact with the phosphorus. In this position, the His^{117} residue would not allow a water molecule to approach the phosphorus. A large conformational change of the His^{117} residue would be required to make room. In addition, if one considers the sulfate–G117H complex to be a structural analogue of the dephosphylation transition state for mechanism B, then the formation of the transition state is obstructed by the ethoxy moiety in the acyl-binding pocket as seen by the superimposition of the sulfate, VX and DEP–G117H (Figure 3). Finally, the imidazole of the His^{117} residue is an obstacle to the formation of the dephosphylation transition state, much like it is an obstacle to the formation of the phosphylation transition state in agreement with kinetic data [16]. These observations argue that a conformational change in the active centre would be necessary for mechanism B to occur. A partially rate-limiting conformational change in the course of forming the transition state for dephosphylation is consistent with the weak pH dependencies observed for dephosphylation [16,17]. QM/MM calculations based on the structures herein would be needed in order to determine if the change of conformation required corresponds to an energy barrier compatible with the measured dephosphylation rate.

Mechanism C

The third mechanism, which was proposed by Millard et al. [16], derives from the suggestion of Kovach [56] that the dephosphylation rate is inversely proportional to the electron density on the phosphorus. Millard proposed that a hydrogen bond between the His^{438} residue and an alkoxy ligand to the phosphorus stabilized the linkage between the phosphorus and the $Ser^{198}-O\gamma$ atom by making the His^{438} residue unavailable to serve in its traditional role of transferring a proton to the Ser^{198} residue. It was proposed that the His^{117} residue would compete with the His^{438} residue by forming a hydrogen bond with the one of the ethoxy groups, thus setting the His^{438} residue free to form a hydrogen bond with a water molecule. Abstraction of a proton from that water molecule would promote attack of the water on the phosphorus atom. The structure of the VX–G117H adduct (Figure 2D) shows no hydrogen-bonding interactions for the imidazole of the His^{117} residue with the ethoxy substituents. The structure of DEP–G117H (Figure 2C) shows the His^{117} residue making hydrogen-bond contact with water molecules but not with the ethoxy substituent. In the DEP–G117H complex the His^{438} residue is at an optimal position to transfer a proton between a water molecule and the serine residue while maintaining a hydrogen bond to an ethoxy group. These observations refute the idea that hydrogen-bonding of the His^{438} residue to an ethoxy group is a critical feature of phosphylated G117H that would prevent it from acting as a base catalyst.

Mechanism D

The structure in Figure 2(C) supports a mechanism in which a water molecule could be activated by the His^{438} residue for attack on the phosphorus atom. The His^{438} residue in DEP–G117H is hydrogen-bonded to a water located near the wide-open face of the DEP adduct, adjacent to the Ser^{198} residue (Scheme 1, pathway C). If the His^{438} residue is deprotonated then it could abstract a proton from the entering water molecule and subsequently transfer it to the serine. Alternatively, if it is protonated then it could serve as a relay in a concerted proton transfer from the water molecule to the catalytic serine residue as depicted in Scheme 1, pathway C. A similar adjacent nucleophilic substitution mechanism has been proposed in some phosphylation and aging reactions of cholinesterases [57,58].

Hydrogen-bonding of the water to the Glu^{197} residue that is seen in Figure 2(C) can further stabilize the approaching water molecule. A role for the Glu^{197} residue in dephosphylation is supported by the observation that there is 40-fold decrease in the dephosphorylation rate of the echothiophate–G117H/E197Q mutant [20], but a 10-fold increase in the dephosphonylation rate for VX– and sarin–G117H/E197Q mutants [18].

In mechanism D, the His^{117} residue could accelerate dephosphylation by destabilizing the transient phosphylserine by

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

steric obstruction. Indeed, the conformation of the His^{117} residue in the DEP− and methylethoxyphosphonyl−G117H transient conjugates, appears to be strained by comparison with the relaxed conformation observed in the fluoride−G117H complex (Figure 3). The imidazole ring puts a lot of strain on the phosphyl moiety and can be viewed as a molecular analogue of a loaded spring. This should result in a high-energy structure, destabilizing the adduct. The destabilizing role of the His^{117} residue in the transition state would therefore be simply steric exclusion. Given this thesis, a diethylphosphoryl adduct is expected to be under greater strain than a methylethoxyphosphonyl adduct, thus explaining the higher hydrolysis rate for echothiophate than for VX. Additionally, if the His^{117} residue is charged, it is expected to enhance the electrophily of the phosphorus atom by a local electrostatic effect. These effects would also be consistent with the modest pH dependence on the dephosphylation step [16,17]. All things considered, mechanism D appears to be most consistent with the X-ray data.

In summary, the structures reported in the present paper are not sufficient to definitively identify the molecular mechanism of G117H phosphyl hydrolysis; however, they do provide a basis on which to question the currently advanced possibilities. In addition, the X-ray structures of the echothiophate−G117H and VX−G117H adducts provide indispensable structural templates for future QM/MM calculations and valuable structural starting points for further explorations into the hydrolysis mechanism. The proposals provided in this discussion also may provide guidance for computational mutagenesis directed at improving the dephosphylation rates for the G117H mutant. A mutagenesis strategy based on computational design was successfully implemented to create a mutant of BChE with improved cocaine hydrolase activity [59]. Such a strategy could be applied to the design of new cholinesterases or other serine hydrolase mutants that can more efficiently reactivate from OP inhibition. Efficient catalytic bioscavengers would provide a great improvement in prophylaxis, decontamination and treatment of organophosphylate poisoning.

AUTHOR CONTRIBUTION

Oksana Lockridge produced and purified the mutant enzyme. Florian Nachon, Eugenie Carletti and Marielle Wandhammer made the crystals, and collected and processed the diffraction data. Yvain Nicolet participated in the diffraction data collection. Florian Nachon analysed the structures. Patrick Masson, Lawrence Schopfer and Florian Nachon wrote the manuscript. Oksana Lockridge and Florian Nachon designed and planned the project.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr S. Lushchekina (University of Lomonosov, Moscow, Russia) for fruitful discussions.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-06-BLAN-0163] and the Direction Generale de l' Armement [grant number DGA/PEA 08co501] to F.N.

REFERENCES

1 Gerlt, J. A. and Babbitt, P. C. (2009) Enzyme (re)design: lessons from natural evolution and computation. Curr. Opin. Chem. Biol. **13**, 10–18
2 Harel, M., Sussman, J. L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulie, J. and Silman, I. (1992) Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 10827–10831
3 Kaplan, D., Ordentlich, A., Barak, D., Ariel, N., Kronman, C., Velan, B. and Shafferman, A. (2001) Does 'butyrylization' of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? Biochemistry **40**, 7433–7445
4 Li, B., Stribley, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S. H. and Lockridge, O. (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J. Neurochem. **75**, 1320–1331
5 Schopfer, L. M., Furlong, C. E. and Lockridge, O. (2010) Development of diagnostics in the search for an explanation of toxic airline syndrome. Anal. Biochem. **404**, 64–74
6 Lockridge, O. and Masson, P. (2000) Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. Neurotoxicology **21**, 113–126
7 Masson, P., Carletti, E. and Nachon, F. (2009) Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. Protein Pept. Lett. **16**, 1215–1224
8 Zheng, F., Yang, W., Ko, M. C., Liu, J., Cho, H., Gao, D., Tong, M., Tai, H. H., Woods, J. H. and Zhan, C. G. (2008) Most efficient cocaine hydrolase designed by virtual screening of transition states. J. Am. Chem. Soc. **130**, 12148–12155
9 Heilbronn, E. (1993) Molecular biology of cholinesterases, a background and an introduction. In Cholinergic Function and Dysfunction. (Cuello, A. C., ed.). pp. 133−138, Elsevier, Amsterdam
10 Lenz, D. E., Broomfield, C. A., Yeung, D. T., Masson, P., Maxwell, D. M. and Cerasoli, D. M. (2007) Nerve agent bioscavengers: progress in development of a new mode of protection against organophosphorus exposure. In Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics (Romano, J. A., Luckey, B. J. and Salem, H., eds), pp. 145−173, CRC Press, Boca Raton
11 Huang, Y. J., Huang, Y., Baldassarre, H., Wang, B., Lazaris, A., Leduc, M., Bilodeau, A. S., Bellemare, A., Cote, M., Herskovits, P. et al. (2007) Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**, 13603–13608
12 Ashani, Y. and Pistinner, S. (2004) Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. Toxicol. Sci. **77**, 358–367
13 Lenz, D. E., Yeung, D., Smith, J. R., Sweeney, R. E., Lumley, L. A. and Cerasoli, D. M. (2007) Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. Toxicology **233**, 31–39
14 Järv, J. (1984) Stereochemical aspects of cholinesterase catalysis. Bioorg. Chem. **12**, 259–278
15 Masson, P., Nachon, F., Broomfield, C. A., Lenz, D. E., Verdier, L., Schopfer, L. M. and Lockridge, O. (2008) A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. Chem. Biol. Interact. **175**, 273–280
16 Millard, C. B., Lockridge, O. and Broomfield, C. A. (1995) Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase. Biochemistry **34**, 15925–15933
17 Lockridge, O., Blong, R. M., Masson, P., Froment, M. T., Millard, C. B. and Broomfield, C. A. (1997) A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. Biochemistry **36**, 786–795
18 Millard, C. B., Lockridge, O. and Broomfield, C. A. (1998) Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase. Biochemistry **37**, 237–247
19 Wang, Y., Boeck, A. T., Duysen, E. G., van Keuren, M., Saunders, T. L. and Lockridge, O. (2004) Resistance to organophosphorus agent toxicity in transgenic mice expressing the G117H mutant of human butyrylcholinesterase. Toxicol. Appl. Pharmacol. **196**, 356–366
20 Schopfer, L. M., Ticu-Boeck, A., Broomfield, C. A. and Lockridge, O. (2004) Mutants of human butyrylcholinesterase with organophosphate hydrolase activity; evidence that His^{117} serves as a general base catalyst. J. Med. Chem. Def. **2**, 1–21
21 Amitay, M. and Shurki, A. (2009) The structure of G117H mutant of butyrylcholinesterase: nerve agents scavenger. Proteins **77**, 370–377
22 Vyas, S., Beck, J. M., Xia, S., Zhang, J. and Hadad, C. M. (2010) Butyrylcholinesterase and G116H, G116S, G117H, G117N, E197Q and G117H/E197Q mutants: a molecular dynamics study. Chem. Biol. Interact. **187**, 241–245
23 Nachon, F., Nicolet, Y., Viguie, N., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C. and Lockridge, O. (2002) Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. Eur. J. Biochem. **269**, 630–637
24 Kabsch, W. (2010) Xds. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **66**, 125–132
25 Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta. Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **50**, 760–763
26 Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. J. Appl. Crystallogr. **30**, 1022–1025
27 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **53**, 240–255

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

28 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **60**, 2126–2132
29 Painter, J. and Merritt, E. A. (2006) Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **62**, 439–450
30 Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W. et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **66**, 213–221
31 Lovell, S. C., Word, J. M., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2000) The penultimate rotamer library. Proteins **40**, 389–408
32 Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C. and Nachon, F. (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. J. Biol. Chem. **278**, 41141–41147
33 Nachon, F., Asojo, O. A., Borgstahl, G. E., Masson, P. and Lockridge, O. (2005) Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: the crystal structure suggests two alternative mechanisms of aging. Biochemistry **44**, 1154–1162
34 Carletti, E., Li, H., Li, B., Ekstrom, F., Nicolet, Y., Loiodice, M., Gillon, E., Froment, M. T., Lockridge, O., Schopfer, L.M et al. (2008) Aging of cholinesterases phosphylated by tabun proceeds through O-dealkylation. J. Am. Chem. Soc. **130**, 16011–16020
35 Carletti, E., Aurbek, N., Gillon, E., Loiodice, M., Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C., Masson, P., Thiermann, H., Nachon, F. and Worek, F. (2009) Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun. Biochem. J. **421**, 97–106
36 Baxter, N. J., Olguin, L. F., Golicnik, M., Feng, G., Hounslow, A. M., Bermel, W., Blackburn, G. M., Hollfelder, F., Waltho, J. P. and Williams, N. H. (2006) A Trojan horse transition state analogue generated by MgF_3^- formation in an enzyme active site. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 14732–14737
37 Cimasoni, G. (1966) Inhibition of cholinesterases by fluoride *in vitro*. Biochem. J. **99**, 133–137
38 Page, J. D., Wilson, I. B. and Silman, I. (1985) Butyrylcholinesterase: inhibition by arsenite, fluoride, and other ligands, cooperativity in binding. Mol. Pharmacol. **27**, 437–443
39 Masson, P., Adkins, S., Gouet, P. and Lockridge, O. (1993) Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese-hamster ovary cells, is a low affinity variant. J. Biol. Chem. **268**, 14329–14341
40 Ashani, Y., Segev, O. and Balan, A. (2004) The effect of fluoride on the scavenging of organophosphates by human butyrylcholinesterase in buffer solutions and human plasma. Toxicol. Appl. Pharmacol. **194**, 90–99
41 Ngamelue, M. N., Homma, K., Lockridge, O. and Asojo, O. A. (2007) Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. **63**, 723–727
42 Xu, Y. W., Morera, S., Janin, J. and Cherfils, J. (1997) AlF_3 mimics the transition state of protein phosphorylation in the crystal structure of nucleoside diphosphate kinase and MgADP. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 3579–3583
43 Li, H., Schopfer, L. M., Nachon, F., Froment, M. T., Masson, P. and Lockridge, O. (2007) Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry. Toxicol. Sci. **100**, 136–145
44 Millard, C. B., Koellner, G., Ordentlich, A., Shafferman, A., Silman, I. and Sussman, J. L. (1999) Reaction products of acetylcholinesterase and VX reveal a mobile histidine in the catalytic triad. J. Am. Chem. Soc. **121**, 9883–9884
45 Masson, P., Froment, M. T., Gillon, E., Nachon, F., Lockridge, O. and Schopfer, L. M. (2007) Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase. Biochim. Biophys. Acta **1774**, 16–34
46 Broomfield, C. A., Lockridge, O. and Millard, C. B. (1999) Protein engineering of a human enzyme that hydrolyzes V and G nerve agents: design, construction and characterization. Chem. Biol. Interact. **119**–**120**, 413–418
47 Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. and Raymond, M. (2003) Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. Nature **423**, 136–137
48 Newcomb, R. D., Campbell, P. M., Ollis, D. L., Cheah, E., Russell, R. J. and Oakeshott, J. G. (1997) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 7464–7468
49 Poyot, T., Nachon, F., Froment, M. T., Loiodice, M., Wieseler, S., Schopfer, L. M., Lockridge, O. and Masson, P. (2006) Mutant of *Bungarus fasciatus* acetylcholinesterase with low affinity and low hydrolase activity toward organophosphorus esters. Biochim. Biophys. Acta **1764**, 1470–1478
50 Albaret, C., Masson, P., Broomfield, C. A., El Kaim, L. and Fortier, P. L. (1998) Mechanical aspects of the phosphotriesterase activity of human butyrylcholinesterase G117H mutant. In Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins (Doctor, B. P., ed.), pp. 399–405, Plenum Press, New York
51 Stock, J. B., Stock, A. M. and Mottonen, J. M. (1990) Signal transduction in bacteria. Nature **344**, 395–400
52 Attwood, P. V., Piggott, M. J., Zu, X. L. and Besant, P. G. (2007) Focus on phosphohistidine. Amino Acids **32**, 145–156
53 Hobbiger, F. (1955) Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphato group. Br. J. Pharmacol. Chemother. **10**, 356–362
54 Broomfield, C. A., Millard, C. B., Lockridge, O. and Caviston, T. L. (1995) Mutation of human butyryl cholinesterase glycine 117 to histidine preserves activity but confers resistance to organophosphorus inhibitors. In Enzymes of the Cholinesterase Family (Quinn, D. M., Balasubramanian, A. S., Doctor, B. P. and Taylor, P., eds), pp. 169–175, Plenum Press, New York
55 Raines, R. T. (1998) Ribonuclease A. Chem. Rev. **98**, 1045–1066
56 Kovach, I. M. (1988) Structure and dynamics of serine hydrolase–organophosphate adducts. J. Enzyme Inhib. **2**, 199–208
57 Kwasnieski, O., Verdier, L., Malacria, M. and Derat, E. (2009) Fixation of the two Tabun isomers in acetylcholinesterase: a QM/MM study. J. Phys. Chem. B **113**, 10001–10007
58 Nachon, F., Carletti, E., Worek, F. and Masson, P. (2010) Aging mechanism of butyrylcholinesterase inhibited by an *N*-methyl analogue of tabun: implications of the trigonal-bipyramidal transition state rearrangement for the phosphylation or reactivation of cholinesterases. Chem. Biol. Interact. **187**, 44–48
59 Zhan, C. G., Zheng, F. and Landry, D. W. (2003) Fundamental reaction mechanism for cocaine hydrolysis in human butyrylcholinesterase. J. Am. Chem. Soc. **125**, 2462–2474

Received 7 October 2010/15 November 2010; accepted 19 November 2010
Published as BJ Immediate Publication 19 November 2010, doi:10.1042/BJ20101648

© The Authors Journal compilation © 2011 Biochemical Society

3. Inhibition de la BChE par le sarin

3-1. Présentation de l'étude

Le sarin est un neurotoxique organophosphoré dont le phosphore central est substitué par un oxygène, un groupement méthyle et un groupement O-isopropyle, plus encombrant, et dont le groupe partant est un atome de fluor comme pour le soman (figure 130). Des études de spectrométrie de masse ont montré que, contrairement au VX et au VR, le conjugué formé par inhibition de la BChE avec une solution racémique de sarin vieillissait par désalkylation (Li, Schopfer *et al.* 2007). Les mesures de constantes cinétiques indiquent que ce vieillissement est relativement lent ($t_{1/2}$=14 h) (Aurbek, Thiermann *et al.* 2009). Ces données suggèrent que le substituant isopropyloxyle pointe vers la poche « choline », à proximité de His438 et Glu197, les résidus catalysant la désalkylation. La résolution de la structure tridimensionnelle de la BChE inhibée par le sarin apparait alors comme d'intérêt pour vérifier cette hypothèse.

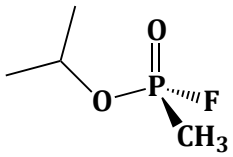


Figure 130 : Structure chimique du sarin.

3-2. Résultats

Les cristaux de BChE inhibée par le sarin ont été obtenus par la méthode de « co-cristallisation ». Le protocole d'obtention des cristaux est le même que celui décrit dans le chapitre n°2, avec une solution protéique à 7 mg/ml inhibée par 0.4 mM de sarin. Plusieurs cristaux ont été analysés, donnant lieu à plusieurs jeux de données dont le traitement a abouti à la même structure pour chacun. Le tableau 131 regroupe les statistiques issues d'un de ces jeux de données.

groupe d'espace	*I422*
paramètres de maille (Å) (a=b , c)	154.3 127.4
source rayons X	ID29 (λ=0.9724)
résolution (Å)	2.4
complétude (%)	99.9
I/σ_I	15.5
redondance	4.9
facteur R_{sym}	7.2
facteur R	0.18
facteur R-free	0.22
facteur B ($Å^2$)	35.2

Tableau 131 : Statistiques de collecte et d'affinement d'un jeu de données pour l'obtention de la structure de la BChE-sarin.

Lors de la préparation des cristaux de BChE inhibée au sarin, la méthode de « co-cristallisation » se traduit par une incubation du conjugué de plusieurs jours en solution (dans la goutte), puis de plusieurs semaines dans le cristal. Si l'inhibition est suivie d'une réaction de vieillissement, dont le $t_{1/2}$ est estimé à 14 heures, ce temps de contact cumulé entre les deux entités devrait être largement suffisant pour que la réaction de vieillissement ait lieu.

De manière très inattendue, et comme observé pour la structure de la BChE inhibée par les agents V, c'est l'adduit P_S du sarin que l'on retrouve dans le site actif, c'est-à-dire que le groupement O-isopropyle se loge dans la poche « acyle », à proximité du Leu286/Ser287/Val288 et que le groupement méthyle se situe à proximité de l'histidine catalytique His438 (figure 132). Tout comme ce qui est observé pour l'inhibition de la BChE par les agents V ou par l'analogue TA4 de tabun, c'est finalement le substituant le plus encombrant qui se loge dans la poche « acyle » alors que le plus petit substituant, le méthyle, pointe vers la poche « choline ». Cette configuration P_S de l'adduit est à l'opposé de l'hypothèse initiale. Il y a donc un désaccord entre les données structurales, d'une part et les données cinétiques et de spectrométrie de masse, d'autre part. Ceci suggère un biais dans l'étude cristallographique découlant, soit d'une faible sélectivité du sarin conduisant à la formation des deux conjugués, suivi de la cristallisation exclusive du conjugué P_S, soit d'un changement de sélectivité résultant de forte

concentrations de sarin utilisées pour inhiber la BChE avant cristallisation (0.4 mM, ratio sarin/BChE 4:1).

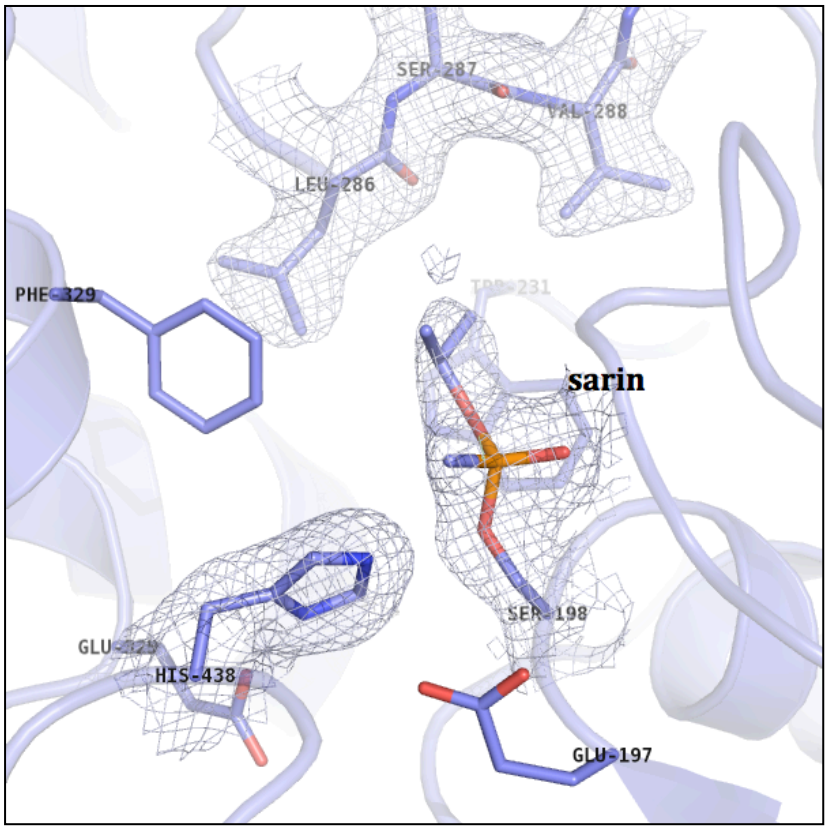


Figure 132 : Structure cristallographique du site actif de la BChE inhibée par le sarin par la méthode de « co-cristallisation ». (Les atomes de carbone sont en violet, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu, l'atome de phosphore en orange. La carte de densité électronique |Fo-Fc| à 1.0 σ est en gris).

Discussion et perspectives

Dans l'objectif de comprendre les mécanismes d'inhibition de la BChE par différents toxiques OP, plusieurs études structurales ont été réalisées, afin d'évaluer la stéréosélectivité de la BChE et d'acquérir les bases structurales pour concevoir des réactivateurs spécifiques de la BChE, candidat de choix dans la prophylaxie des intoxications aux composés organophosphorés.

La résolution des structures cristallographiques de BChE inhibée par une solution racémique d'agents V, de sarin ou d'analogue TA4 du tabun ou encore celle du mutant G117H de la BChE inhibée par une solution racémique de VX aboutissent à la même observation : **le substituant le plus encombrant stériquement, porté par le phosphore de l'adduit, se loge dans la poche « acyle »**. Cela conduit à l'impossibilité d'une réaction de vieillissement dans le cas des agents V, que ce soit pour la BChE ou son mutant, et hypothétiquement, à un vieillissement par hydrolyse du groupement N-méthyle dans le cas d'une inhibition par l'analogue TA4 du tabun.

Au niveau de la stéréosélectivité de la BChE, l'adduit formé dans chacun des cas de figure est de **configuration P_S**.

Deux mécanismes d'inhibition peuvent être proposés, comme suggéré pour le TA4 par Nachon *et al.* (Nachon, Carletti *et al.* 2010) (figure 133).

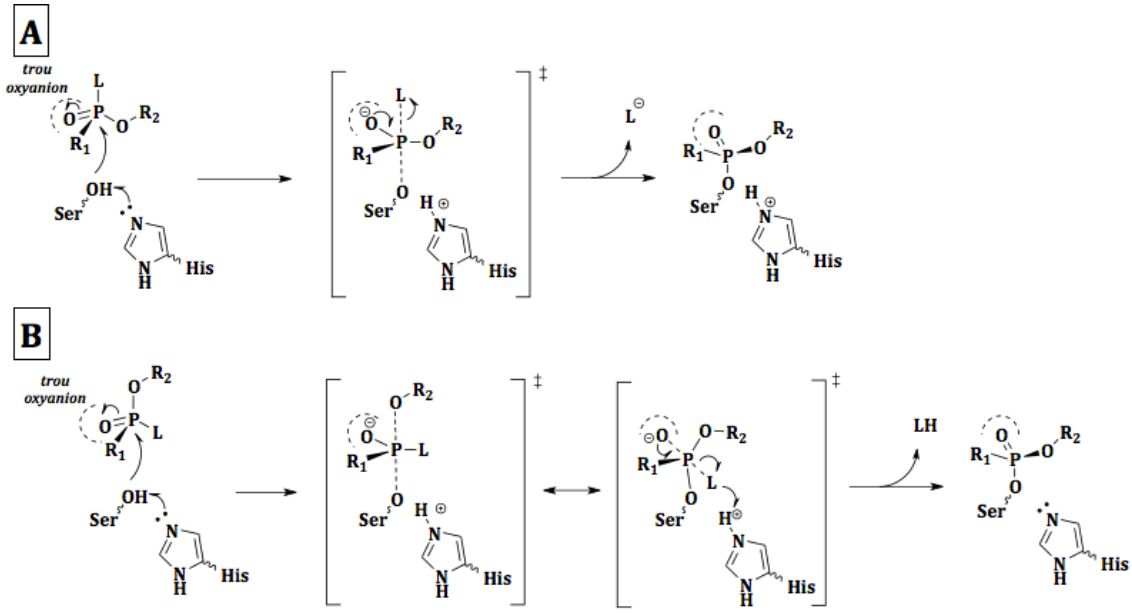


Figure 133 : Proposition des deux mécanismes d'inhibition de la BChE par un OP conduisant à l'adduit de configuration P_S, soit par une attaque en ligne (A) , soit par une attaque adjacente suivie d'une pseudorotation (B).(R_1 et R_2 sont des chaines carbonées, L est le groupe partant).

En effet, en considérant que la réaction entre la sérine catalytique et le composé OP est une substitution nucléophile **en ligne** (figure 134-A), c'est-à-dire départ de groupe partant en opposition du nucléophile entrant, via un état de transition pentacoordiné, il apparaît que pour obtenir la configuration P_S de l'adduit phosphonylsérine, l'enzyme doit réagir préférentiellement avec l'énantiomère P_R en raison de l'inversion de la configuration du phosphore.

En revanche, si c'est l'énantiomère P_S qui réagit sur la sérine catalytique pour obtenir l'adduit P_S, le mécanisme proposé suppose une **attaque nucléophile** de l'oxygène de la sérine catalytique de manière **adjacente** au groupe partant, suivie d'une **pseudorotation** de l'état de transition pentacoordiné pour permettre le départ du groupe partant (figure 134-B). Parmi ces deux mécanismes possibles, le premier reste le postulat avancé la plupart du temps dans le cas d'inhibition des cholinestérases par les OP, notamment dans l'hAChE. En effet, dans la plupart des cas, les études cinétiques et structurales ont permis de mettre en évidence une préférence de stéréosélectivité de l'hAChE pour l'énantiomère P_S, considéré alors comme le plus toxique, avec formation d'un adduit de configuration P_R et possibilité de subir la réaction de vieillissement. Cette inversion de configuration est corrélée au mécanisme d'attaque en ligne.

En ce qui concerne le tabun et par extension, l'analogue TA4, leur configuration absolue n'est pas connue. D'après les données expérimentales, il apparaît que le (-)-tabun inhibe environ 400 fois plus rapidement l'hAChE que le (+)-tabun (Tenberken, Thiermann *et al.* 2010). Malheureusement, il n'a pas été défini à quelle configuration P_R ou P_S ces deux stéréoisomères correspondent. Les deux mécanismes d'inhibition de la BChE conduisant à l'adduit P_S sont donc envisageables.

En revanche, la configuration absolue des agents V et du sarin est connue. Ainsi, il a été montré, par différentes études, et notamment notre étude structurale qui a fait l'objet de la publication 1, que la stéréosélectivité de la BChE vis à vis du VX, et par extension celle vis à vis des agents CVX et VR, est différente de celle de l'hAChE. En effet, l'adduit P_S obtenue après inhibition de la BChE par une solution racémique de VX est de même configuration que l'adduit obtenu après inhibition de la BChE par une solution pure d'énantiomère P_R de VX, c'est-à-dire par une attaque nucléophile en ligne. A noter que l'inhibition par une solution pure d'énantiomère

P_S de VX conduit logiquement à l'adduit P_R. Ainsi, la BChE réagit préférentiellement avec l'énantiomère de VX le moins toxique, du moins dans la gamme de concentration utilisée pour les inhibitions (centaine de µM). Etant donné l'homologie de structure qu'il existe entre les agents V étudiés, cette conclusion peut s'appliquer également au CVX et au VR. Elle s'applique également au mutant G117H de la BChE dont les résultats structuraux sont identiques à ceux obtenus pour la BChE sauvage.

Quant au sarin, l'énantiomère P_S apparaît comme étant le plus toxique car il réagit plus de 2000 fois plus vite avec l'hAChE que l'énantiomère P_R (Cohen, Kronman *et al.* 2006). Ce rapport de vitesse d'inhibition tombe à 7 pour la BChE, mais sans toutefois disparaître. Pourtant, la structure du conjugué BChE-sarin indique que c'est l'énantiomère P_R, le moins toxique qui est sélectionné, si l'attaque est bien en ligne. Ce point ne sera vérifié qu'après résolution de la structure cristallographique de la BChE en complexe avec chacun de deux énantiomères de sarin, comme cela a été réalisé pour le VX.

La résolution d'une structure de BChE inhibée au sarin par trempage court et long a été initiée afin de compléter les données obtenus par « co-cristallisation ». Dans le cas d'un trempage court, on évite la réaction de désalkylation par congélation rapide. Dans le cas d'un trempage long, on laisse la possibilité au conjugué de vieillir. Ces données supplémentaires permettraient de comparer les structures de la BChE inhibée et de la BChE vieillie, s'il y a lieu. Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune des conditions testées n'a permis l'obtention de cristaux de BChE en complexe covalent avec le sarin par trempage. Pourtant, la méthode de trempage dans la BChE est optimisée, régulièrement employée, d'autant plus avec les OP, qui réagissent rapidement et de manière irréversible avec la sérine catalytique. Ce résultat surprenant va dans le sens de l'hypothèse d'un biais méthodologique dû à l'état cristallin de l'enzyme : ni l'isomère P_S du sarin, ni le P_R ne réagiraient rapidement avec l'enzyme sous forme cristalline, et seule l'enzyme ayant réagit en solution avec l'isomère P_R serait capable de cristalliser. Le travail avec des solutions d'énantiomères purs de sarin permettrait de simplifier les interprétations.

L’utilisation de la BChE comme bioépurateur en cas d’intoxication aux OP apparaît pour de nombreuses équipes de recherche, un moyen prophylactique efficace et prometteur. Néanmoins, l’étude structurale de l’énantiosélectivité de la BChE vis à vis des agents V et du sarin a montré, avec l’appui d’autres études, la faible stéréosélectivité de la BChE. Ceci implique que des concentrations rigoureusement stœchiométriques d'enzyme soient nécessaires pour piéger la totalité de l'énantiomère le plus toxique en circulation. Cette nécessité peut entraîner un surcoût important en regard des quantités d'enzyme nécessaires. Le même constat est valable concernant le mutant G117H de la BChE, candidat en tant que bioépurateur catalytique des intoxications aux OP. Aussi, le développement de l'hAChE, qui a, par essence, la stéréosélectivité la plus adaptée pour piéger les inhibiteurs les plus dangereux, semblerait économiquement plus pertinent.

PARTIE EXPERIMENTALE

Docking moléculaire

1. Préparation du récepteur

Les dynamiques moléculaires sont réalisées en utilisant GROMACS 4.5.4 (Hess, Kutzner *et al.* 2008) et le champ de force amber99sb (Hornak, Abel *et al.* 2006) pour les acides aminés connus. L'acide aminé modifié « sérine méthylphosphonylée », correspondant à la sérine catalytique vieillie par le soman ne posséde pas de champ de force connu par amber99Sb. Nous avons donc développé le champ de force pour ce résidu modifiée. La sérine méthylphosphonylée est construite en utilisant Chimera (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) afin d'optimiser sa géométrie au niveau de la mécanique moléculaire. Les charges RESP (Restrained Electrostatic Potential) du résidu modifié sont calculées à partir du serveur REDS (Vanquelef, Simon *et al.* 2011). La procédure préconisée par ce dernier inclut une optimisation de mécanique quantique du résidu obtenu à partir de l'ensemble Gaussian09 au niveau théorique HF/6-31G*. Les paramètres de champ de force qui ne sont pas disponibles dans amber99sb sont tirés du champ de force GAFF (Wang, Wolf *et al.* 2004) en utilisant acpype (Sousa da Silva, Vranken *et al.* 2010) et Antechamber (Wang, Wang *et al.* 2006). Le nouveau champ de force décrivant la sérine méthylphosphonylée est ensuite inclus dans le champ de force amber99sb.

Le récepteur 1 est basé sur la structure du complexe formé par l'AChE humaine et la fasciculine (pdb code 1B41) dont les boucles manquantes ont été reconstruites à l'aide de MODELLER (Fiser, Do *et al.* 2000). La méthylphosphonylsérine est construite à l'aide du logiciel Chimera en se basant sur la géométrie de l'adduit dans la structure vieillie d'AChE de torpille inhibée par le soman (1SOM). L'histidine 447 et le glutamate 202 sont tous deux protonés. La protéine est incluse dans une boîte cubique avec une distance minimum de 9 Å entre la protéine et les faces de la boîte. La boîte est ensuite solvatée en utilisant le modèle de solvant TIP3P et en ajoutant des ions sodium et chlorure pour neutraliser le système. Les simulations sont effectuées à l'aide du champ de force amber99sb modifié, avec un schéma de couplage de la température à 300 K via un thermostat de type Berendsen, et la méthode du maillage particulier d'Ewald pour déterminer les interactions électrostatiques de longue distance (maximum 9 Å). Une minimisation d'énergie avec descente de gradient (500 pas) est suivi d'une dynamique

moléculaire de 20 ps avec contrainte sur les positions pour relaxer les molécules de solvant et des pas temporels de 2 fs. La structure résultante est ensuite à nouveau minimisée avec descente de gradient (500 pas). Les molécules d'eau non structurales sont éliminées du modèle, et le fichier pdb est converti en format pdbqt à l'aide du logiciel AutodockTools 1.4.5 (Sanner 1999).

Le récepteur 2 est construit à partir de la structure cristallographique du complexe entre l'huprine Z et l'hAChE résolue au laboratoire (Carletti, communication personnelle). L'huprine Z est remplacée manuellement par la chlorotacrine, construite à l'aide de Chimera. Les paramètres de champs de forces de la chlorotacrine compatible avec amber99sb sont calculés à partir du format mol2 à l'aide du logiciel acpype. La méthylphosphonylsérine est construite à l'aide du logiciel Chimera, comme pour le récepteur 1. La suite de la préparation inclut une minimisation d'énergie suivie d'une dynamique moléculaire de 20 ps avec contraintes sur les positions suivant le même protocole que pour le récepteur 1. Les molécules d'eau et la chlorotacrine sont éliminées du modèle final et le fichier pdb final est converti en fichier au format pdbqt à l'aide du logiciel AutodockTools 1.4.5.

Les calculs de docking utilisent Autodock VINA 1.0, beta 02 (http://vina.scripps.edu) (Trott and Olson 2010). La zone d'exploration est un cube de 15 Å de côté, centré sur l'hydrogène HW1 de la molécule d'eau n°665 dans le site actif et dont les coordonnées sont 47.247, 50.551 et 54.042, respectivement sur les axes *x*, *y* et *z*.

Les résultats obtenus correspondent aux trois conformations les plus énergétiquement favorables et dont les affinités de liaisons du complexe récepteur-ligand predites sont exprimées en $kcal.mol^{-1}$ (variation de l'énergie libre de liaison, ΔG).

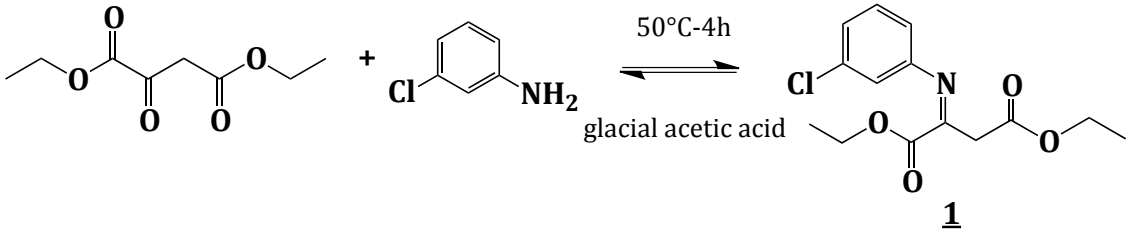
2. Préparation des ligands

Le modèle moléculaire de chaque ligand est construit à partir du serveur GlycoBioChem PRODRG2 (Schuttelkopf and van Aalten 2004). Le logiciel Chimera permet la protonation les atomes en tenant compte de l'état de protonation à pH physiologique. Le calcul des charges utilise le module Antechamber d'Amber attribuant le type et la charge partielle à chaque atome ainsi que le type de liaison

à chacune d'elle (Wang, Wang *et al.* 2006). La charge totale est alors déterminée à partir de la méthode semi-empirique AM1-BCC avec correction de la charge des liaisons, paramétrée pour reproduire *ab initio* les potentiels électrostatiques. La structure du ligand est alors minimisée en combinant ces paramètres atomiques ainsi que d'autres paramètres du champ de force GAFF (Wang, Wolf *et al.* 2004). On obtient deux fichiers d'extension « .pdb » et « .mol2», contenant la description du ligand (types d'atomes, connexions interatomiques, coordonnées des atomes) pour le premier auquel sont ajoutés les charges partielles dans le second. Un fichier au format pdbqt est généré automatiquement à partir du fichier mol2 par le logiciel AutoDockTools 1.4.5.

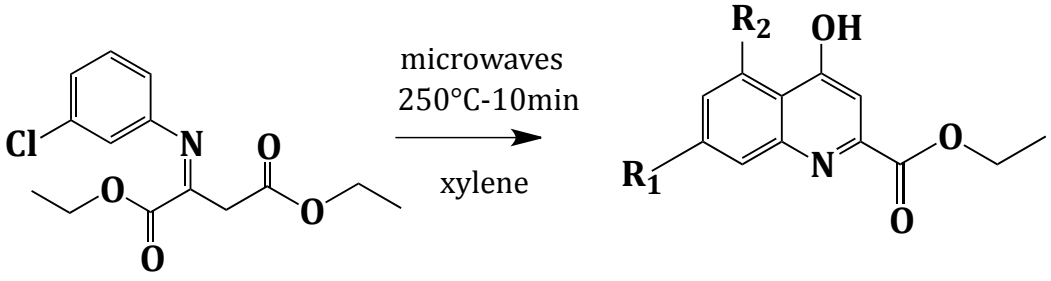
Synthèse chimique

1. Synthesis of 7-chloro-4-HydroxyQuinoline-2-Methyl Aldoxime (HQMA)



1

9.4g of diethyloxaloacetate (0.05mol) and 8ml of 3-chloroaniline (0.076mol, 1.5eqv) are dissolved in 36ml glacial acetic acid. The mixture was stirred during 4 hours at 50°C (TLC analysis with AcOEt/Heptane : 3/7) then was allowed to cool to room temperature. After 17 hours, 50ml sodium hydroxide 35% was added to obtained about pH 7.0 and the mixture was extracted with ether. The organic layer was washed subsequently three times with NaOH 0,5N 100mL and HCl 0,5N 100mL and dried under pressure. We obtained a dark crude oil.



1 **2**

1.12g of **1** was solubilized in 10mL xylene in a sealed tube with a bar magnet. Microwaves were applied according to the following program:

- 8 minutes of temperature rise up to 250°C
- then, 10 minutes to 250°C.

The crude turned yellow and a light precipitate appeared. The yellow solid was filtered and washed with heptane (the yellow color is due to the presence of an impurity to be eliminated). With purification on column chromatography on silica gel (eluent: Heptane/AcOEt 8/2 to 4/6), two fractions were recovered:

- a mixture of both isomers A/B 70/30 with A: R_1=Cl and R_2=H and B: R_1=H and R_2=Cl

R_F **B** (AcOEt) = 0.6

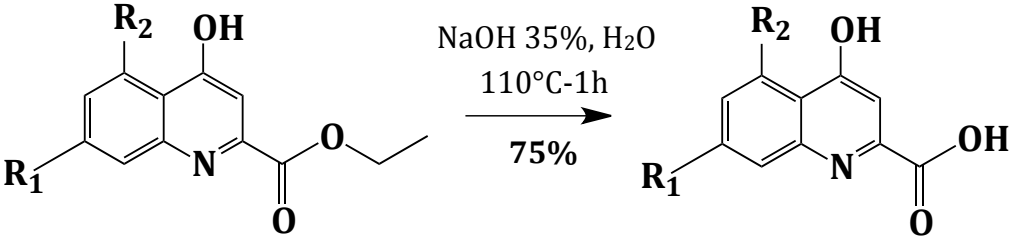
R_F **A** (AcOEt) = 0.58

- pure isomer A with 15% of yield

NMR-^{1}H 2 (300MHz) DMSO-D_6: δ/ppm

Isomer A 7-Chloro : 1.36 (3H t ^{3}J=7Hz CH_3 ester); 4.42 (2H quad ^{3}J=7Hz CH_2 ester); 6.67 (1H s H_3); 7.39 (1H dd ^{3}J=8.8Hz ^{4}J=2Hz H_6); 8.00 (1H dblt ^{4}J=2Hz H_8); 8.06 (1H d ^{3}J=8.8Hz H_5); 12.07 (1H s OH)

ESI m/z: 252 $[M+H]^+$



2 **3**

mixture of isomers A/B mixture of isomers A/B

{A: R_1=Cl; R_2=H / B: R_1=H; R_2=Cl}

The insoluble mixture of the ester **2** 205mg (0.817mmol) in 1mL aqueous sodium hydroxyde 35%, and 6mL distilled H_2O was heated under reflux conditions. The yellow suspension fully dissolved to give a limpid yellow solution after 1 hour at 110°C. TLC analysis (AcOEt/Heptane:1/1) showed complete hydrolysis. The solution was allowed to cool to room temperature and pH adjusted to 2, by adding drops of HCl 10%. An instantaneous precipitation was observed upon acidification. The suspension was stood 30 minutes in an ice bath and the white precipitate filtered and washed with iced H_2O. The acid **3** was obtained as an off white powder (m=0.136g; 75%)

R_F **2** (AcOEt/heptane: 1/1) = 0.31

R_F **3** (AcOEt/heptane: 1/1) = 0

NMR-^{1}H 2 (400MHz) DMSO-D_6: δ/ppm

Isomer A 7-Chloro: 1.36 (3H t ^{3}J=7Hz CH_3 ester); 4.42 (2H quad ^{3}J=7Hz CH_2 ester); 6.67 (1H s H_3); 7.39 (1H dd ^{3}J=8.8Hz ^{4}J=2Hz H_6); 8.00 (1H dblt ^{4}J=2Hz H_8); 8.06 (1H d ^{3}J=8.8Hz H_5); 12.07 (1H s OH)

Isomer B 5-chloro: 1.36 (3H t ^{3}J=7.1Hz CH_3 ester); 4.41 (2H quad ^{3}J=7.1Hz CH_2 ester); 6.59 (1H s H_3); 7.32 (1H large d ^{3}J=7.5Hz H_6); 7.59 (1H dd ^{3}J=8.3Hz ^{3}J=8.4Hz H_7); 7.91 (1H dd ^{3}J=8.5Hz ^{4}J=1.0Hz H_8); 12.01 (1H s OH)

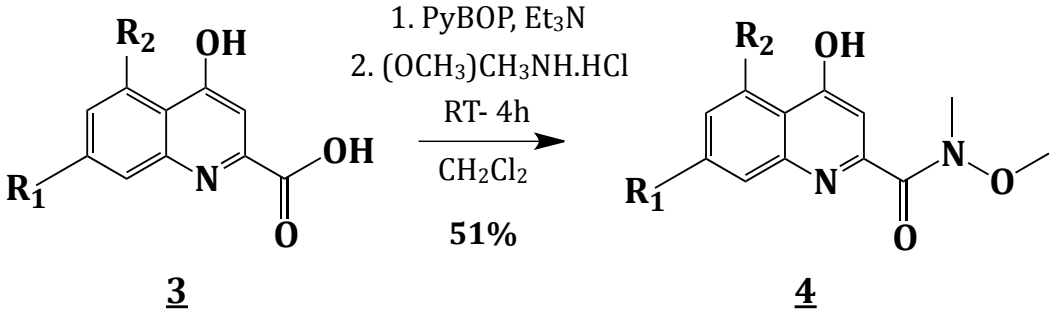
ESI m/z: 252 $[M+H]^+$

NMR-^{1}H 3 (400MHz) DMSO-D_6: δ/ppm

Isomer A 7-Chloro: 6.56 (1H d ^{4}J=1.2Hz H_3); 7.37 (1H large d ^{3}J=8.7Hz H_6); 8.01 (1H d ^{4}J=1.5Hz H_8); 8.06 (1H dd ^{3}J=8.7Hz ^{4}J=1.2Hz H_5)

Isomer B 5-Chloro: 6.64 (1H d ^{4}J=1.3Hz H_3); 7.30 (1H large d ^{3}J=7.5Hz H_6); 7.56. (1H dd ^{3}J=8.2Hz ^{3}J=8.6Hz H_7); 7.91 (1H d ^{3}J=8.4Hz H_8)

ESI m/z: 224 $[M+H]^+$



3 **4**

mixture of isomers A/B isomer A / isomer B : 6/4

{ A: R_1=Cl; R_2=H
B: R_1=H; R_2=Cl }

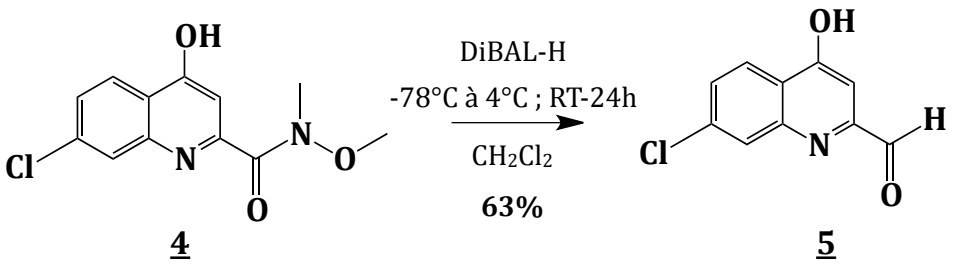
To a stirred solution of the acid **3** 136mg (0,61mmol), NEt_3 100µL (0.71mmol ; 1.2eqv), in 15mL dry CH_2Cl_2 was added a solution of pyBOP 476mg (0.92mmol ; 1.5eqv) in 3mL dry CH_2Cl_2 under argon atmosphere. After stirring 15 minutes at room temperature, "Weinreb amine" (OMe)MeNH.HCl 122mg (1.22mmol; 2.0eqv) and NEt_3 170uL (1.22mmol ; 2.0eqv) were added and allowed to stir 4 hours at room temperature. Dichloromethane 100mL was added to dilute, and then washed subsequently with aqueous saturated $NaHCO_3$ 50mL, and aqHCl 1% 50mL. The

organic extract was dried on anhydrous Na_2SO_4, filtered and solvents removed to afford the crude as a thick viscous oil. Purification on column chromatography on silica gel (eluent: 100% AcOEt to AcOEt/CH_3OH: 9.5/0.5) yielded the *5-Cl isomer* (27mg) and the *7-Cl isomer* (42mg) as light yellow oils (total yield : 51%)

R_F *5-Cl* isomer (AcOEt 100%) = 0.23
R_F *7-Cl* isomer (AcOEt 100%) = 0.18

NMR-^{1}H (300MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm
Isomer A 7-Chloro: 3.40 (3H s CH_3); 3.7 (3H s OCH_3); 6.60 (1H s H_3); 7.42 (1H dd ^{3}J=8.8Hz ^{4}J=2.0Hz H_6); 7.71 (1H d ^{4}J=2.0Hz H_8); 8.21 (1H d ^{3}J=8.7Hz H_5)

NMR-^{1}H (300MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm
Isomer B 5-Chloro: 3.40 (3H s CH_3); 3.73 (3H s OCH_3); 6.52 (1H s H_3); 7.38 (1H dd ^{4}J=3.2 Hz ^{3}J=6.0Hz H_7); 7.57 (1H d ^{4}J=3.0Hz H_8); 7.58 (1H d ^{3}J=5.6Hz H_6)
ESI m/Z: 267 $[M+H]^+$

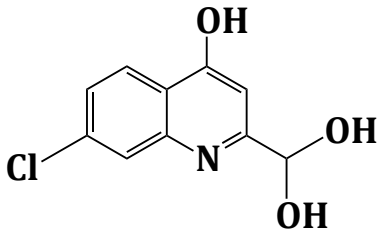


4 **5**

DIBAL-H solution (1M in toluene) 450µl (0.50mmol; 3eqv) was added dropwise at -78°C to a stirred solution of the 7-Chloro Weinreb amide 42mg (0.16mmol) in 7mL dry CH_2Cl_2 under argon atmosphere. After stirring 2 hours at this temperature, the mixture was allowed to warm to 4°C overnight. Additional stirring at room temperature 24 hours was applied. 500µL H_2O was added to quench, and CH_2Cl_2 evaporated. The orange residue was diluted with 40mL H_2O, followed by extraction of the product with AcOEt (4x40mL). The organic extract was dried on anhydrous Na_2SO_4 and solvents removed to afford an orange powder as the crude product.

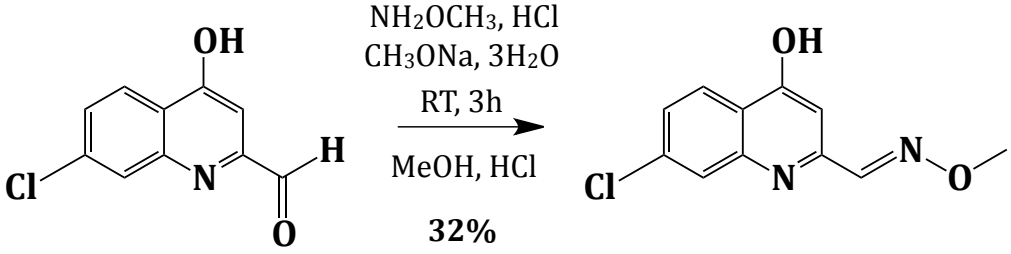
Purification by column chromatography on silica gel (eluent: AcOEt/Heptane:1/1 to 100% AcOEt) yielded 20mg of a light yellow powder. Hydrated form of the aldehyde was observed on NMR.

R_F *7-Cl* aldehyde (AcOEt 100%) = 0.31



NMR-^{1}H (300MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm

5.55 (1H s Hα); 6.47 (1H s H_3); 7.38 (1H dd ^{3}J=9.0Hz ^{4}J=1.9Hz H_6); 7.81 (1H d ^{4}J=1.9Hz H_8); 8.19 (1H d ^{3}J=8.8Hz H_5)



5 **6**

The 7-chloro aldehyde 20mg (0.097mmol), methylhydroxylamine.HCl 19mg (0.146mmol; 1.5eqv), sodium acetate trihydrate 13mg (0.097mmol; 1eqv) and catalytic amounts of HCl 37% (10uL) were allowed to stir in CH_3OH (2mL) at room temperature. TLC analysis (AcOEt 100%) after 3 hours at room temperature showed no staring material. Methanol solvent was evaporated, 5mL H_2O was added and pH adjusted to ~7, followed by extraction of the product with AcOEt (3x 10mL), drying on anhydrous Na_2SO_4, evaporation of solvents afforded an off white solid as the crude product. Product partially soluble in methanol. Purification on a HPLC chain using a isocratic mode : A/B: 70/30 ; t_R= 13.4 minutes.

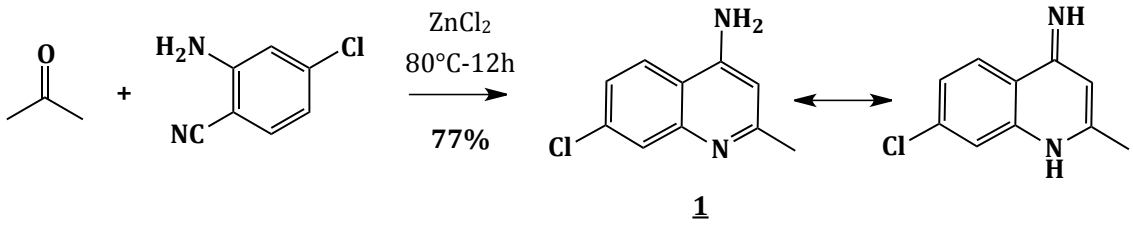
[A: H_2O milliQ + 0.1% added TFA; B: acetonitrile HPLC grade]

NMR-^{1}H (400MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm

4.04 (3H s CH_{3oxime}) ; 6.38 (1H s H_3) ; 7.16 (1H dd ^{3}J=8.7Hz ^{4}J=1.9Hz H_6) ; 7.77 (1H d ^{3}J=1.9Hz H_8) ; 8.01 (1H s CH_{oxime}) ; 8.11 (1H d ^{3}J=8.8Hz H_5)

ESI m/z: 237 $[M+H]^+$

2. Synthesis of 7-chloro-4-AminoQuinoline-2-Carbaldehyde Oxime (AQCO)



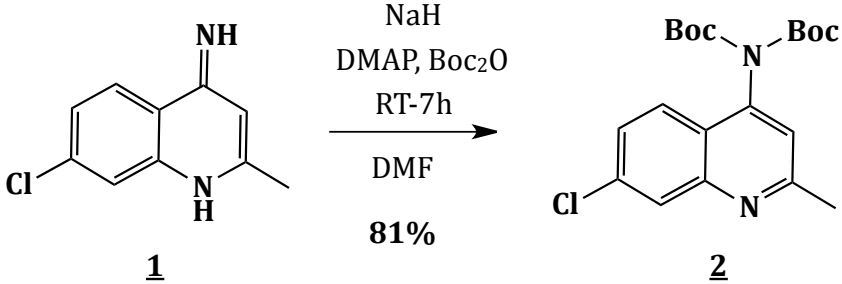
1

1.53g of 4-amino-2-chlorobenzonitrile (10mmol) and 2.78g of anhydrous $ZnCl_2$ (20mmol, 2eqv) were dissolved in 20 ml of acetone (200mmol, 20eqv). The mixture was refluxed overnight. Thereafter, the mixture was cooled to room temperature; then 40ml of diethyl ether was added and the mixture stirred for 30 minutes. The mixture was filtered. The yellow precipitate was recovered and stirred with 50ml of NaOH 5N for 5h. "2-methyl-AQ" **1** was obtained by filtration and drying of the yellow precipitate under reduced pressure (1.49g, 77%).

NMR-^{1}H (400MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm

2.50 (3H s CH_3) ; 6.54 (1H s H_3) ; 7.32-7.35 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 7.33 (1H d ^{4}J =2.0Hz H_8) ; 8.00-8.02 (1H d ^{3}J=8.9Hz H_5).

ESI m/Z: 193 $[M+H]^+$



1 **2**

1.49g of "2-methyl-AQ" (7.7mmol) was dissolved in 100ml of dimethylformamide (DMF). 557mg of NaH (23.2mmol, 3eqv) was added and the mixture was stirred

for 15 minutes before adding of 2.86g of dimethylaminopyridine (DMAP) (23.2mmol, 3eqv), then 5.5ml of ditertbutyl-dicarbonate (Boc_2O) (23.3mmol, 3eqv). The mixture was stirred at room temperature for 7 hours. DMF was evaporated under reduced pressure. The crude was extracted with AcOEt/$NaHCO_3$. Protected "2-methyl-AQ" **2** was obtained by purification on silica column using heptane/AcOEt 9:1 (2.45g, 81%).

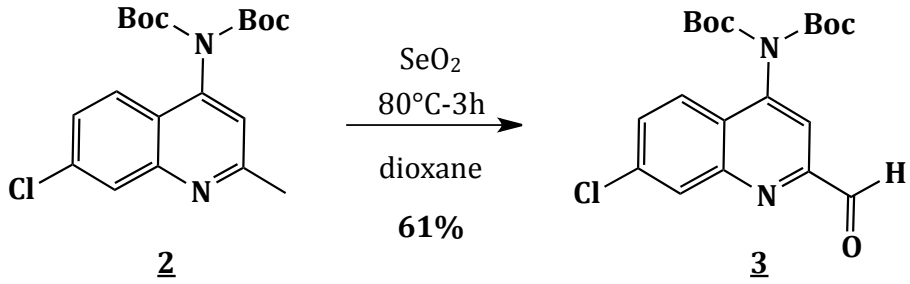
NMR-^{1}H (400MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm

1.38 (18H s CH_3(Boc)) ; 2.78 (3H s CH_3) ; 7.45 (1H s H_3) ; 7.65-7.68 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 7.84-7.86 (1H d ^{3}J=8.9Hz H_5) ; 8.07 (1H d ^{4}J = 2.0Hz H_8).

ESI m/Z: 281 $[M+H]^+$ (two Boc groups without *tert*-butyl)

337 $[M+H]^+$ (two Boc group with one *tetr*-butyl)

393 $[M+H]^+$ (two Boc groups with *tert*-butyl)



2 **3**

2.45g of protected "2-methyl-AQ" (6.2mmol) in 30ml of anhydrous 1,4-dioxane was heated to 60°C. 1.38g of SeO_2 (12.4mmol, 2eqv) was added to this solution. The temperature was increased to 80°C. After 3 hours, the mixture was cooled at room temperature. The precipitate was filtered and washed with 1,4-dioxane. The organic layer was concentrated and the crude product was purified on silica column using heptanec/AcOEt 9:1. Protected "2-carbaldehyde-AQ" **3** was a off-white powder (1.54g, 61%).

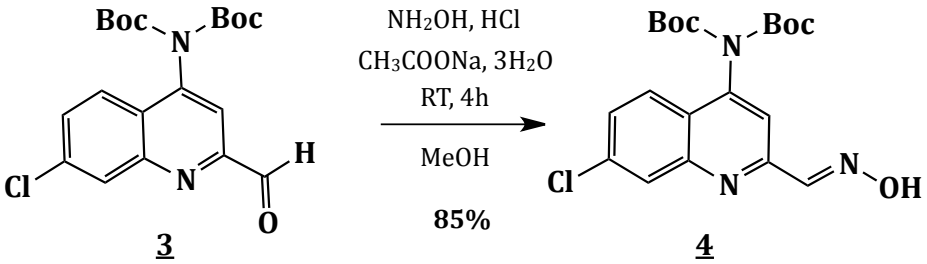
NMR-^{1}H (400MHz) $CDCl_3$: δ/ppm

1.35 (18H s CH_3(Boc))) ; 7.69-7.72 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 7.86 (1H s H_3) ; 7.87-7.89 (1H d ^{3}J=8.9Hz H_5) ; 8.32 (1H d ^{4}J=2.0Hz H_8) ; δ = 10.22 (1H s $H_{aldehyde}$).

ESI m/Z: 295 $[M+H]^+$ (two Boc groups without *tert*-butyl)

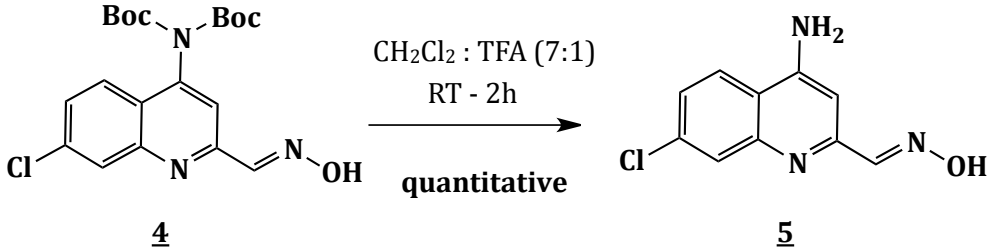
351 $[M+H]^+$ (two Boc groups with one *tert*-butyl)

407 $[M+H]^+$ (two Boc groups with *tert*-butyl)



3 **4**

125mg protected "2-carbaldehyde-AQ" **3** (0.3mmol) was dissolved by a solution containing 38mg of hydroxylamine hydrochloride (0.6mmol, 1.8eqv) and 52mg of sodium acetate trihydrate (0.4mmol, 1.2eqv) in 10mL of methanol. The mixture was stirred 4 hours at room temperature. To stop the reaction, methanol was evaporated and replaced by 10ml of water. pH was adjusted to 7 by addition of potassium carbonate. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 50ml). The organic layer was dried and the crude material was purified on silica gel using heptane/AcOEt 9:1. Protected "2-aldoxime-AQ" **4** was obtained with a yield of 85% (110mg).



4 **5**

"2-aldoxime-AQ" **4** was quantitatively deprotected by a mixture CH_2Cl_2 / TFA (7:1) at room temperature for 2 hours.

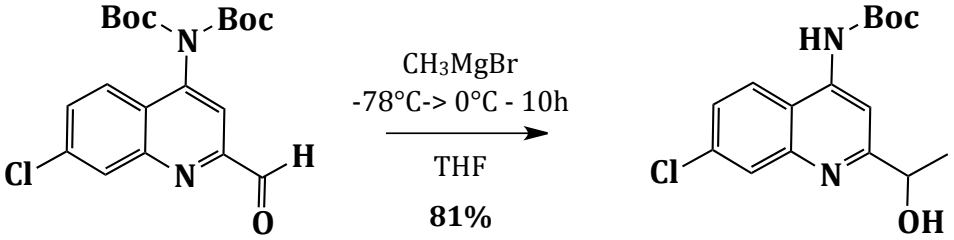
NMR-^{1}H (400MHz) CD_3OD-D_4: δ/ppm

1.63 (1H s NH_2) ; 6.99 (1H s H_3) ; 7.66-7.69 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 8.01 (1H d ^{4}J=2.0Hz H_8) ; 8.20 (1H s H_{oxime}) ; 8.30-8.32 (1H d ^{3}J = 8.9Hz H_5).

ESI m/Z: 222 $[M+H]^+$

3. Synthesis of 7-chloro-4-AminoQuinoline-2-BRomoacetyl (AQBR)

The protocol to obtained protected « 2-carbaldehyde-AQ » (**3**) used the same contitions than for the synthesis of « 2-aldoxime-AQ ».



3 **6**

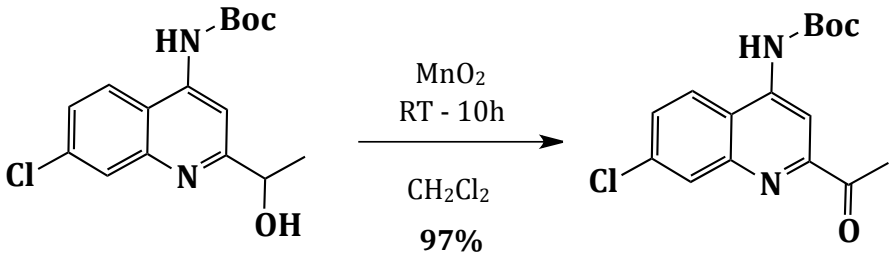
701mg of « 2-carbaldehyde-AQ » **3** (1.7mmol) in 6ml of anhydrous THF was cooled at -78°C. 1.8ml of methylmagnesium bromide (5.4mmol, 3.2eqv) was added and the mixture was slowly heated at 0°C for 10 hours. The reaction was stopped by addition of water. The pH was adjusted to 8 with HCl 10%. The crude mixture was extracted with ether and purified on silica gel using heptane/AcOEt 9:1 then 6:4. Protected « 2-ethanol-AQ » (**6**) was a light-green powder (449mg, 81%).

NMR-^{1}H (300MHz) $CDCl_3$: δ/ppm

1.57 (9H s CH_3(Boc)); 1.59 (3H s $CH_{3alcool}$); 4.95-5.02 (1H q ^{4}J=6.7Hz, ^{3}J=13.2Hz CH_{alcool}) ; 7.48-7.52 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 8.71-8.74 (1H d ^{3}J=8.9Hz H_5) ; 8.08 (1H d ^{4}J=2.0Hz H_8) ; δ = 8.09 (1H s H_3).

ESI m/Z: 267 $[M+H]^+$ (one Boc groups without *tert*-butyl)

323 $[M+H]^+$ (one Boc groups with *tert*-butyl)



6 **7**

2g of manganese dioxide (20mmol, 15eqv) was added to 445mg of protected « 2-ethanol-AQ » **6** (1.3mmol), previously dissolved in 15ml of anhydrous CH_2Cl_2 at room temperature. After 10 hours, the mixture was filtered through Celite, washed

with CH_2Cl_2 and the organic layer was evaporated and dried. We obtained 430mg of pure protected « 2-ethanone-AQ » (**7**) (light-green powder) (97%).

NMR-^{1}H (300MHz) $CDCl_3$: δ/ppm

1.60 (9H s CH_3(Boc)) ; 2.82 (3H s H_{ketone}) ; 7.57-7.61 (1H dd ^{3}J=8.9Hz, ^{4}J=2.0Hz H_6) ; 7.79-7.82 (1H d ^{3}J=8.9Hz H_5) ; 8.21 (1H d ^{4}J=2.0Hz H_8) ; 8.72 (1H s H_3).

ESI m/Z: 265 $[M+H]^+$ (one Boc groups without *tert*-butyl)

321 $[M+H]^+$ (one Boc groups with *tert*-butyl)

Evaluation de l'activité biologique

1. Préliminaire

1-1. Production des cholinestérases recombinantes

1-1-1. L'AChE humaine

Le mutant recombinant L544Stop monomérique d'AChE humaine correspond au monomère tronqué dont le codon 544 à été remplacé par un codon stop et ce, afin de supprimer le domaine C-terminal de tétramérisatin de l'enzyme. Le gène de l'hAChE recombinante est alors inséré dans un vecteur d'expressin eucaryote pGS possédant un promoteur du cytomégalovirus et le gène de la glutamine synthétase. Le plasmide est ensuite transfecté dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Les cellules transfectées sont cultivées en milieu riche (UltraCulture ; BioWhittaker), contenant 25 µM de méthionine sulfoximide, inhibiteur de la glutamine synthétase, à 37°C et 5 % CO_2, en bouteilles roulantes. L'hAChE ainsi produite est directement sécrétée dans le milieu de culture.

1-1-2. La BChE humaine (BChE) et l'AChE de souris (*m*AChE)

Pour les mêmes raisons que pour l'AChE humaine, la BChE est tronquée au résidu 529. 4 des 9 sites consensus de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) se situant à la surface de l'enzyme ont été supprimés par mutagenèse dirigée afin de limiter l'hétérogénéité de glycosylation de l'enzyme et ainsi favoriser sa cristallisation (Nachon, Nicolet *et al.* 2002). Ainsi, les résidus Asn17, 455, 481 et 486 ont été remplacés par des résidus Gln.

En ce qui concerne le gène de la *m*AChE, tout comme l'hAChE, il est tronqué au niveau du codon 544.

Les protocoles d'expression de la BChE et de la *m*AChE sont identiques à celui utilisé pour l'hAChE.

1-2. Purification des cholinestérases recombinantes

Comme les ChEs sont sécrétées dans le milieu de culture, la première étape de séparation consiste à précipiter les protéines à 80% de saturation en sulfate d'ammonium. Les culots de précipité obtenus après centrifugation sont alors resuspendus et dialysés contre du tampon Tris 20 mM-pH 7.4, afin d'éliminer le

sulfate d'ammonium. Une ou plusieurs étapes de chromatographie sont nécessaires à la purification, selon la cholinestérase.

1-2-1. Purification des AChEs

Que ce soit pour l'hAChE ou la *m*AChE, une seule étape de chromatographie d'affinité est nécessaire à leur purification. Son principe repose sur l'interaction spécifique entre l'AChE et la procaïnamide, un ligand des ChEs, greffée sur une résine de Sepharose-4B (GE Life Sciences).

Après passage du dialysat contenant l'AChE en tampon Tris 20 mM-pH 7.4 sur la résine, un rinçage utilisant une force ionique supérieure (tampon Tris 20 mM-pH 7.4 contenant 0.5 M de NaCl) permet l'élimination des molécules liées de manière aspécifique à la résine. L'AChE est ensuite éluée par un tampon Tris 20 mM-pH 7.4 contenant 1 M de NaCl, 0.5 M de chlorure de tétraméthylammonium et 1 mM de chlorure de décaméthonium. Ce dernier, en tant que ligand spécifique, entre en compétition avec l'AChE afin que l'enzyme se décroche de la résine. Les fractions contenant une activité cholinestérasique importante sont poolées, rinçées en tampon Tris 20 mM-pH 7.4 afin d'éliminer les sels et ligands présents à l'élution et concentrées sur des unités d'ultrafiltration Centricon-30 (Amicon) jusqu'à une concentration de 8 mg/ml pour l'hAChE et 15 mg/ml pour la *m*AChE. Le contrôle de la concentration en AChE pure est déterminée à partir de l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire ε_{280} de 1.85 $mg.ml^{-1}.cm^{-1}$. Les enzymes sont ensuite aliquotées et stockées à -80°C. La quantité d'enzyme obtenue pour 1 L de culture est d'environ 5 mg pour la *m*AChE et 10 mg pour l'hAChE.

1-2-2. Purification de la BChE

La première étape de purification de la BChE est également une chromatographie d'affinité. Elle se réalise dans le même tampon que pour l'AChE. Le ligand greffé à la résine Sepharose 4B est une huprine, HUP24, inhibiteur spécifique des ChEs (Ronco, Foucault *et al.* 2011). La BChE est éluée par 0.1 M de NaCl en tampon Tris 20 mM-pH 7.4 contenant 0.5 M de chlorure de tétraméthylammonium.

Avant la seconde étape de purification, les fractions contenant l'activité cholinestérasique la plus importante sont poolées et concentrées sur des unités d'ultrafiltration Centricon-30. Etant donné que les conditions d'élution lors de la

première chromatographie sont moins stringentes que pour l'AChE, des molécules de haut poids moléculaire peuvent s'accrocher de manière aspécifique à la résine et donc être co-éluées avec la BChE. Une étape de chromatographie d'exclusion sur SuperDex™ 200 (GE HealthCare) est alors nécessaire en tampon Tris 20mM-pH 7.4 supplémenté par 100 mM de NaCl. Elle permet de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, entre 10 et 600 kDa, et donc d'éliminer ces grosses molécules. La concentration en BChE dans les aliquots est de 8 mg/ml (ε_{280} = 1.74 $mg.ml^{-1}.cm^{-1}$), également stockés à -80°C.

1-3. Mesure de l'activité cholinestérasique

Les mesures d'activité cholinestérasique sont réalisées par spectrophotométrie selon la méthode d'Ellman (Ellman, Courtney *et al.* 1961) sur un spectrophotomètre Uvikon943. L'enzyme est incubée en présence de son substrat dans un tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4 et à 25°C, contenant 0.5 mM d'acide 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB). L'activité cholinestérasique correspond au coefficient directeur de la droite de variation de l'absorbance, à la longueur d'onde de 412 nm, enregistrée sur 1 minute.

1-4. Inhibition de l'hAChE par le VX sur colonne PD-10 (GE HealthCare®)

50 µl d'hAChE (6.2 mg/ml) sont dilués dans 2.5 ml de tampon phosphate de sodium à 0.1 M-pH 7.4, afin d'obtenir une solution à 2 µM. Cet échantillon de 2.5 ml, volume maximal du dépôt sur colonne PD-10, est inhibé par 5 équivalents de VX racémique, en respectant la présence de 5 % maximum d'isopropanol, soit 25 µl de solution de VX à 1 mM (10 µM final). On laisse incuber le milieu réactionnel 15 minutes à température ambiante.

Les colonnes PD-10 sont conservées à température ambiante, dans un tampon de conservation, préalablement éliminé. Les solutions migrent dans la résine par simple gravité. Ensuite, une colonne par échantillon est équilibrée par 5 x 4 ml de tampon phosphate de sodium à 0.1 M-pH 7.4. L'échantillon d'enzyme inhibée est alors déposé puis, après son passage total dans la résine, on élue par 3 ml de tampon phosphate de sodium à 0.1 M, pH 7.4. On récupère donc 3 ml d'hAChE totalement inhibée par la VX à 1.7 µM. On vérifie l'inhibition par une mesure d'activité.

L'échantillon est aliquoté, congelé dans l'azote liquide et stockés à -80°C pour éviter toute réaction de vieillissement.

1-5. Mesure du pKa du ligand n°01

Différentes solutions à 100 µM de ligand n°01 sont réalisées en tampon phosphate de sodium à 0.1 M, à des pH compris entre 4.5 et 9.5, toutes les 0.5 unité-pH. Le spectre d'absorption du ligand n°01 est enregistré, pour ces différents pH, à des longueurs d'ondes comprises entre 290 et 400 nm.

2. Evaluation de l'affinité

2-1. Mesure de la Concentration Inhibitrice à 50% (IC_{50})….

2-1-1. …. du ligand n°22

10 nM d'hAChE sont incubés 90 minutes avec le ligand n°22 à des concentrations variant entre 100 nM et 2 mM. Un aliquot de chacun de ces échantillons est prélevé pour mesurer l'activité cholinestérasique résiduelle, en présence d'une concentration fixe en ATC à 1 mM. On représente cette activité résiduelle en fonction de la concentration en ligand n°22.

2-1-2. …. des ligands basés sur le noyau pyridinium

10 nM d'hAChE sont mis en présence des différents ligands, à des concentrations variant de 500 nM à 3 mM selon les ligands. Les solutions-mère de ligands étant préparés en DMSO, et celui étant légèrement inhibiteur de l'activité cholinestérasique, toutes les mesures sont réalisées en présence de 1 % fixe de DMSO. Un aliquot de chacun de ces échantillons est prélevé, sans incubation, pour mesurer l'activité cholinestérasique résiduelle, en présence d'une concentration fixe en ATC à 1 mM.

2-2. Mesure de la Constante d'Inhibition (Ki)….

2-2-1. …. du ligand n°22.

10 nM d'hAChE sont incubés une nuit à 25°C avec différentes concentrations en ligand n°22 (0, 25, 75 et 150 µM) dans du tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4 contenant 5% de méthanol et 1 mg/ml de BSA. L'activité cholinestérasique est mesurée sur des aliquots de ces échantillons en présence de différentes

concentrations en ATC, de 1 µM à 10 mM. On représente la vitesse initiale (DO/min à 412 nm) en fonction de la concentration en ATC, pour chacune des concentrations en ligand n°22.

2-2-2. …. du ligand n°01.

10 nM d'hAChE sont mis en présence de différentes concentrations en ligand n°01 (0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 µM) dans du tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4 contenant 5% de méthanol et 1 mg/ml de BSA. L'activité cholinestérasique est mesurée sur des aliquots de ces échantillons, sans incubation préalable, en présence de différentes concentrations en ATC, de 100 µM à 1 mM. On représente la vitesse initiale (DO/min à 412 nm) en fonction de la concentration en ATC, pour chacune des concentrations en ligand n°01. Deux séries ont été réalisées.

2-2-3. …. des ligands basés sur le noyau pyridinium

10 nM d'hAChE sont mis en présence de différentes concentrations des différents ligands (concentrations encadrant la valeur de IC_{50} pour chacun des ligands) dans 0.1 M de tampon phosphate de sodium, pH 7.4 contenant 5% de méthanol et 1 mg/ml de BSA. L'activité cholinestérasique est mesurée sur des aliquots de ces échantillons, sans incubation préalable, en présence de différentes concentrations en ATC, de 100 µM à 1 mM. On représente la vitesse initiale (DO/min à 412 nm) en fonction de la concentration en ATC, pour chacune des concentrations en ligand n°01. Les valeurs de Ki sont déterminées en fonction d'un modèle d'inhibition compétitive ou non-compétitive selon les ligands.

3. Evaluation de la réactivité

3-1. Test de réactivation de l'hAChE inhibée par le VX…..

3-1-1. ….. par le HI-6.

43 nM d'hAChE inhibée au VX, obtenus selon le protocole précédemment décrit (paragraphe « *1-4. Inhibition de l'hAChE par le VX sur colonne PD-10 »*) sont préparés en tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4, auquel on ajoute 1 mg/ml de BSA et 0.1 mg/ml d'azide de sodium pour stabiliser la protéine le temps de l'expérience. 500 µM final d'une solution de HI-6 sont ajoutés à t_0. Des mesures

d'activité cholinestérasique sont réalisées régulièrement sur 180 minutes sur des aliquots de 10 µl (dilution x 100 dans la cuvette).

3-1-2. ….. par le ligand n°01

43 nM d'hAChE inhibée au VX sont incubés à 37°C en tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4 contenant 1 mg/ml de BSA et 0.1 mg/ml d'azide de sodium. Différentes concentrations de ligand n°01 (10, 25, 50, 75, 100, 250 et 500 µM) y sont ajoutées. A différents temps d'incubation, l'activité cholinestérasique d'aliquots de 10 µl du mélange réactionnel (dilution 100 fois) est mesurée en utilisant 1 mM d'ATC comme substrat et le pourcentage d'activité résiduelle est calculée par rapport à l'activité maximale obtenue par réactivation au HI-6 (voir paragraphe 3-1-1).

3 séries de mesures ont été réalisées aux différentes concentrations.

3-1-3. ….. par le ligand n°01, en fonction du pH.

43 nM d'hAChE inhibée au VX sont incubés à 37°C en tampon phosphate de sodium 0.1 M, contenant 1 mg/ml de BSA et 0.1 mg/ml d'azide de sodium à différents pH (6.5, 7, 7.4 et 8). 100 µM de ligand n°01 sont ajoutés au milieu réactionnel. A différents temps d'incubation, l'activité cholinestérasique d'aliquots de 10 µl du mélange réactionnel (dilution 100 fois) est mesurée en utilisant 1 mM d'ATC comme substrat et le pourcentage d'activité résiduelle est calculée par rapport à l'activité maximale obtenue par réactivation au HI-6 (voir paragraphe 3-1-1).

<u>3-2. Test de réactivation de l'hAChE vieillie par le soman….</u>

3-2-1. ….. par le ligand n°22

10 nM d'hAChE sont incubés 1 heure avec 1 µM de soman en tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4, contenant 1 mg/ml de BSA et 0.1 mg/ml d'azide de sodium, temps suffisant pour permettre l'inhibition et le vieillissement de l'hAChE par le soman. 150 µM de ligand n°22 sont alors ajoutés au mélange protéique. Des aliquots de 30 µl sont régulièrement prélevés et l'activité cholinestérasique résiduelle mesurée avec 1 mM d'ATC. La cinétique est suivie sur 10 heures.

3-2-2. ….. par les ligands basés sur le noyau pyridinium

30 nM d'hAChE dans 0.1 M de tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.4, contenant 1 mg/ml de BSA et 0.1 mg/ml d'azide de sodium sont incubés à 4°C avec 2 µM de soman. Après 24 heures d'incubation, temps permettant le vieillissement de l'hAChE, le ligand à tester est ajouté au milieu réactionnel à une concentration pouvant varier entre 100 µM et 2 mM selon le ligand. Après 2 heures d'incubation à 37°C, la réactivation est déclenchée par l'ajout de 500 µM de HI-6 au mélange. L'activité cholinestérasique résiduelle est mesurée sur des aliquots de 30 µl du mélange en présence de 1 mM d'ATC sur une durée de 20 heures.

4. Mise au point préliminaire d'une méthode de mesure d'affinité vis à vis de l'hAChE vieillie par thermofluorescence

Chacun des échantillons contient 10 µM final d'hAChE, préalablement mis en présence des ligands à tester, auquel est ajouté 2X final de colorant SYPRO®Orange (Invitrogen), et pour chacun d'entre eux à un volume de 10 µl dans des capillaires.

Les concentrations en OP et ligands varient en fonction de l'expérimentation. Les mesures sont réalisées dans un appareils LightCycler® 1.0 ou 1.5 (Roche), initialement prévus pour des expérimentations de PCR en temps réel. Les échantillons sont déposés dans des capillaires, dont la contenance maximale est 20 µl. Ces capillaires sont ensuites disposés sur un carrousel, pouvant accueillir 32 échantillons différents, puis introduits dans l'appareil. Lors de la mesure, les échantillons sont excités à une longueur d'onde de 470 nm par une LED haute luminosité. Trois canaux de détection sont disponibles, pour différentes longueurs d'ondes d'émission (530 nm, 645 nm et 710 nm), le premier étant celui utilisé pour nos mesures. Le cycle de chauffage se déroule entre 30 et 75°C, avec une montée de 1°C par minute. La mesure de fluorescence est faite à chaque fin de palier correspondant à 1°C supplémentaire.

Les conditions particulières lors de la préparation des échantillons sont précisées dans la partie « Résultats ».

Etudes cristallographiques

Les solutions stock sont préparées à 10 mM dans le DMSO pour des ligands non covalents, dans l'isopropanol pour les OP (VX, soman et sarin) et en eau distillée pour le 2-PAM.

La cristallisation est réalisée par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue dans des boites de cristallographie Easy-Xtal (Qiagen).

1. Cristaux d'hAChE

1-1. hAChE native

L'hAChE native pure (7.8 mg/ml) est stockée en tampon Tris/HCl 20 mM-pH 7.4.

Y sont ajoutés les ligands non covalents à une concentration comprise entre 0.5 et 0.8 mM final. Puis, après une incubation sur la nuit, la fasciculine II (Latoxan) à 1 mg/ml, afin de stabiliser l'enzyme et favoriser sa cristallisation.

L'hAChE cristallise dans une solution contenant 0.1 M de tampon HEPES, pH 7.4 et 1.15 M de sulfate d'ammonium. Une incubation à 10°C a permis d'obtenir des cristaux d'environ 50 µM en plusieurs semaines et d'environ 100 µM en plusieurs mois. Avant collecte des données de diffraction, les cristaux sont trempés dans une solution cryoprotectante (0.1 M de tampon HEPES, pH 7.4 et 1.3 M sulfate d'ammonium, contenant 20 % glycerol) et congelés dans l'azote liquide.

1-2. hAChE vieillie par le soman

L'hAChE purifiée (7.8 mg/ml) est préalablement inhibée par 0.4 mM de soman dans 20 mM de tampon Tris/HCl-pH 7.4. Le mélange réactionnel est incubé 2 heures à 4°C, temps suffisant pour permettre le vieillissement. Les conditions d'obtention des complexes entre hAChE vieillie par le soman et les ligands non covalents ainsi que le protocole de cristallisation sont les mêmes que ceux utilisés pour l'hAChE native.

2. Cristaux de mAChE

2-1. mAChE native

La *m*AChE purifiée (15 mg/ml) cristallise à partir d'une solution à 0.1 M de tampon bicine à pH 9.0 supplémentée par 1.7 M de sulfate d'ammonium. Nous avons obtenu des cristaux de 300 µM après deux semaines d'incubation à 4°C.

2-2. mAChE inhibée par le VX

La *m*AChE purifiée (15 mg/ml) est inhibée en solution par 0.4 mM de VX, incubée une nuit, puis les cristaux sont préparés selon le même protocole que pour la *m*AChE native.

2-3. mAChE vieillie par le soman

Deux protocoles ont été testés afin d'obtenir des cristaux de *m*AChE vieillie par le soman :

1. La *m*AChE purifiée (15 mg/ml) est inhibée en solution par 0.4 mM de soman. Après quelques minutes d'incubation, les cristaux sont préparés à partir du mélange réactionnel par le même protocole que pour la *m*AChE native.
2. Des cristaux de *m*AChE native sont trempés dans une solution à 0.4 mM de soman toute la nuit, pour permettre le vieillissement.

Tous les cristaux de *m*AChE, native, inhibée par le VX ou vieillie par le soman, sont trempés dans une solution à 0.4 mM de ligand non covalent pendant 3 heures à 4°C. Les cristaux sont ensuite lavés par une solution cryoprotectante (0.1M de tampon Tris pH 8.2, 1.8 M de sulfate d'ammonium et 8% de DMSO, contenant 20 % glycérol) et congelés dans l'azote liquide.

3. Cristaux de BChE

3-1. BChE native

Les cristaux de BChE sont obtenus à partir d'une solution protéique à 8 mg/ml en de tampon MES 0.5 mM, pH 6.5. La BChE cristallise dans une solution contenant 0.1 M de tampon MES à pH 6.5 et 2.1 M de sulfate d'ammonium, après incubation à 20°C, pendant 3 semaines environ. Ces cristaux sont ensuite trempés 2 heures dans une solution contenant 0.4 mM de ligands non covalents, lavés dans une solution cryoprotectante (0.1 M de tampon MES, pH 6.5 et 2.3 M de sulfate d'ammonium, contenant 20 % glycerol) et congelés en azote liquide.

3-2. BChE vieillie par le soman

Les cristaux de BChE vieillie par le soman sont obtenus par le même protocole que ceux de BChE native avec une solution de BChE à 8 mg/ml préalablement inhibée par une solution à 0.6 mM de soman. Les conditions de croissance des cristaux ainsi que les conditions de trempage dans des solutions contenant les ligands non covalents sont réalisés selon le même protocole que pour la BChE native.

3-3. BChE inhibée par le sarin

Une solution protéique de BChE à 8 mg/ml est préalablement inhibée par 0.4 mM de sarin. Les cristaux sont ensuite préparés selon le protocole de cristallogenèse de la BChE native.

4. Collecte et traitement des données

Les données de diffraction sont collectées à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble) sur différentes lignes de lumière. Les jeux de données sont ensuite traités par le logiciel XDS *(http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/)* (Kabsch 2010) et les structures sont résolues par l'utilisation de la suite CCP4 (1994). Les modèles moléculaires sont des structures connues et résolues de ChEs et, majoritairement issues de la Protein Data Bank. L'affinement des structures utilise les programmes MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010) et REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.* 1997) et la construction du modèle le logiciel COOT (Emsley, Lohkamp *et al.* 2010).

Les ligands sont construits à partir du serveur Dundee PRODRG 2.5, incluant une minimisation d'énergie par le champ de force GROMOS 96.1. La description de groupe TLS (translation libration screwmotion), à l'aide du serveur TLS Motion Determination, permet d'améliorer les statistiques du modèle (facteur R et facteur R-free). Les structures des protéines obtenues ont été illustrées en utilisant le programme PyMol.

BIBLIOGRAPHIE

(1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 5): 760-763.
Abdel-Rahman, A. A. H., G. A. Winterfeld, et al. (2002). "Trichloroacetimidate as a Leaving Group in the Ferrier Rearrangement: Highly Stereoselective Synthesis of Pseudogalactal Glycosides." European Journal of Organic Chemistry (4): 713-717.
Afriat, L., C. Roodveldt, et al. (2006). "The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase." Biochemistry **45**(46): 13677-13686.
Aldridge, W. N. and E. Reiner (1969). "Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate." Biochem J **115**(2): 147-162.
Aldridge, W. N. and E. Reiner, Eds. (1972). Enzyme inhibitors as substrates - Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids, North-Holland Pub. Co. - Amsterdam.
Alvarez, A., C. Opazo, et al. (1997). "Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils." J Mol Biol **272**(3): 348-361.
Aracava, Y., E. F. Pereira, et al. (2009). "Effectiveness of donepezil, rivastigmine, and (+/-)huperzine A in counteracting the acute toxicity of organophosphorus nerve agents: comparison with galantamine." J Pharmacol Exp Ther **331**(3): 1014-1024.
Arpagaus, M., M. Kott, et al. (1990). "Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy." Biochemistry **29**(1): 124-131.
Artursson, E., C. Akfur, et al. (2009). "Reactivation of tabun-hAChE investigated by structurally analogous oximes and mutagenesis." Toxicology **265**(3): 108-114.
Ashani, Y., A. K. Bhattacharjee, et al. (2003). "Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators." Biochem Pharmacol **66**(2): 191-202.
Ashani, Y., D. Grauer, et al. (1998). Current capabilities in extrapolating from animal to human the capacity of human BChE yo detoxify organophosphates. Structure and Function of Cholinesterase an related proteins. B. P. Doctor, P. Taylor, D. M. Quinn, R. L. Rotundo and M. K. Gentry. NY, Plenum Press**:** 255-260.
Ashani, Y., J. Grunwald, et al. (1994). "Role of tyrosine 337 in the binding of huperzine A to the active site of human acetylcholinesterase." Mol Pharmacol **45**(3): 555-560.
Ashani, Y., J. O. Peggins, 3rd, et al. (1992). "Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A." Biochem Biophys Res Commun **184**(2): 719-726.
Ashani, Y. and S. Pistinner (2004). "Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model." Toxicol Sci **77**(2): 358-367.
Ashani, Y., Z. Radic, et al. (1995). "Amino acid residues controlling reactivation of organophosphonyl conjugates of acetylcholinesterase by mono- and bisquaternary oximes." J Biol Chem **270**(11): 6370-6380.
Aurbek, N., H. Thiermann, et al. (2009). "Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis." Toxicology **259**(3): 133-139.
Bajgar, J., K. Kuca, et al. (2007). "Cholinesterase reactivators: the fate and effects in the organism poisoned with organophosphates/nerve agents." Curr Drug Metab **8**(8): 803-809.
Bajgar, J., J. Patocka, et al. (1975). "Antidotal therapy and changes of acetylcholinesterase activity following isopropyl methylphosphonofluoridate intoxication in mice." Acta Biol Med Ger **34**(6): 1049-1055.
Bakke, B. A., M. C. McIntosh, et al. (2005). "Improved alkylation and product stability in phosphotriester formation through quinone methide reactions with dialkyl phosphates." J Org Chem **70**(11): 4338-4345.

Barak, D., C. Kronman, et al. (1994). "Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core." J Biol Chem **269**(9): 6296-6305.
Barak, D., A. Ordentlich, et al. (1995). "Allosteric modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral ligands involves a conformational transition of the anionic subsite." Biochemistry **34**(47): 15444-15452.
Barak, D., A. Ordentlich, et al. (2000). "Evidence for P-N bond scission in phosphoroamidate nerve agent adducts of human acetylcholinesterase." Biochemistry **39**(5): 1156-1161.
Battisti, V., M. R. Schetinger, et al. (2009). "Changes in acetylcholinesterase (AchE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients." Clin Chim Acta **402**(1-2): 114-118.
Battye, T. G., L. Kontogiannis, et al. (2011). "iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 271-281.
Becker, C., F. Worek, et al. (2010). "Chromatographic analysis of toxic phosphylated oximes (POX): a brief overview." Drug Test Anal **2**(10): 460-468.
Becker, G., A. Kawan, et al. (2007). "Direct reaction of oximes with crotylsarin, cyclosarin, or VX in vitro." Arch Toxicol **81**(6): 415-420.
Becker, G., A. Kawan, et al. (1997). "Direct reaction of oximes with sarin, soman, or tabun in vitro." Arch Toxicol **71**(11): 714-718.
Benning, M. M., S. B. Hong, et al. (2000). "The binding of substrate analogs to phosphotriesterase." J Biol Chem **275**(39): 30556-30560.
Benning, M. M., J. M. Kuo, et al. (1994). "Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents." Biochemistry **33**(50): 15001-15007.
Benning, M. M., J. M. Kuo, et al. (1995). "Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase." Biochemistry **34**(25): 7973-7978.
Benning, M. M., H. Shim, et al. (2001). "High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta." Biochemistry **40**(9): 2712-2722.
Benschop, H. P. and L. P. De Jong (1988). "Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology." Acc Chem Res **21**(10): 368-374.
Berend, S., B. Radic, et al. (2010). "The antidotal efficacy of the bispyridinium oximes K027 and TMB-4 against tabun poisoning in mice." Chem Biol Interact **187**(1-3): 291-294.
Berkowitz, E. M. and H. Silk (1981). "Methylation of chromosomal DNA by two alkylating agents differing in carcinogenic potential." Cancer Lett **12**(4): 311-321.
Berman, H. A. and K. Leonard (1992). "Interaction of tetrahydroaminoacridine with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase." Mol Pharmacol **41**(2): 412-418.
Berthelot, J. M., C. Guette, et al. (1989). "Bromation régiosélective en série aromatique. I : Monobromation en position para de phenols et d'amines aromatiques par le tribromure de tetrabutylammonium." Can J Chem **67**.
Bird, S. B., A. Dawson, et al. (2010). "Enzymes and bioscavengers for prophylaxis and treatment of organophosphate poisoning." Front Biosci (Schol Ed) **2**: 209-220.
Bismuth, C. (1993). "Armes chimiques, description et risques toxiques." Réanim. Urgence **2**: 625-633.
Blondet, B., G. Carpentier, et al. (2010). "Localization of butyrylcholinesterase at the neuromuscular junction of normal and acetylcholinesterase knockout mice." J Histochem Cytochem **58**(12): 1075-1082.
Boekelheide, V. and W. J. Linn (1954). "Rearrangements of N-Oxides. A Novel Synthesis of Pyridyl Carbinols and Aldehydes." J Am Chem Soc **76**(5): 1286-1291.
Bon, S. (1982). "Molecular forms of acetylcholinesterase in developing Torpedo embryos." Neurochem Int **4**(6): 577-585.

Bourne, Y., P. Taylor, et al. (2003). "Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site." EMBO J **22**(1): 1-12.
Brenner, T., Y. Hamra-Amitay, et al. (2003). "The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis." FASEB J **17**(2): 214-222.
Broomfield, C. A., O. Lockridge, et al. (1999). "Protein engineering of a human enzyme that hydrolyzes V and G nerve agents: design, construction and characterization." Chem Biol Interact **119-120**: 413-418.
Brown, D. A. (2010). "Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms." J Mol Neurosci **41**(3): 340-346.
Bui, J. M., K. Tai, et al. (2004). "Acetylcholinesterase: enhanced fluctuations and alternative routes to the active site in the complex with fasciculin-2." J Am Chem Soc **126**(23): 7198-7205.
Cabal, J., K. Kuca, et al. (2004). "Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase." Basic Clin Pharmacol Toxicol **95**(2): 81-86.
Cadogan, J. I. G. and D. T. Eastlick (1970). "Neighbouring group-induced phosphorus–oxygen fission in acidic hydrolysis of phosphonates." J Chem Soc D: 1546-1547.
Cadogan, J. I. G. and J. A. Maynard (1966). "The reaction of ethyl hydrogen methylphosphonate with p-nitrobenzonitrile oxide: its relevance to the possible reactivation of "aged" phosphonylated acetylcholinesterase." Chem Commun (London): 854-855.
Calic, M., A. L. Vrdoljak, et al. (2006). "In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity." Toxicology **219**(1-3): 85-96.
Camps, P., B. Cusack, et al. (2000). "Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease." Mol Pharmacol **57**(2): 409-417.
Carletti, E., N. Aurbek, et al. (2009). "Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun." Biochem J **421**(1): 97-106.
Carletti, E., J. P. Colletier, et al. (2010). "Structural evidence that human acetylcholinesterase inhibited by tabun ages through O-dealkylation." J Med Chem **53**(10): 4002-4008.
Carletti, E., H. Li, et al. (2008). "Aging of cholinesterases phosphylated by tabun proceeds through O-dealkylation." J Am Chem Soc **130**(47): 16011-16020.
Carletti, E., L. M. Schopfer, et al. (2011). "Reaction of cresyl saligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry, and X-ray structure analysis." Chem Res Toxicol **24**(6): 797-808.
Carr, P. D. and D. L. Ollis (2009). "Alpha/beta hydrolase fold: an update." Protein Pept Lett **16**(10): 1137-1148.
Caulfield, M. P. and N. J. Birdsall (1998). "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." Pharmacol Rev **50**(2): 279-290.
Chatonnet, A. and O. Lockridge (1989). "Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase." Biochem J **260**(3): 625-634.
Chen-Goodspeed, M., M. A. Sogorb, et al. (2001). "Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase." Biochemistry **40**(5): 1325-1331.
Cho, C. M., A. Mulchandani, et al. (2002). "Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents." Appl Environ Microbiol **68**(4): 2026-2030.
Clothier, B. and M. K. Johnson (1979). "Rapid aging of neurotoxic esterase after inhibition by di-isopropyl phosphorofluoridate." Biochem J **177**(2): 549-558.
Cochran, R., J. Kalisiak, et al. (2011). "Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging." J Biol Chem.

Cochran, R., J. Kalisiak, et al. (2011). "Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging." J Biol Chem **286**(34): 29718-29724.
Cohen, O., C. Kronman, et al. (2006). "Comparison of polyethylene glycol-conjugated recombinant human acetylcholinesterase and serum human butyrylcholinesterase as bioscavengers of organophosphate compounds." Mol Pharmacol **70**(3): 1121-1131.
Colletier, J. P., D. Fournier, et al. (2006). "Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase." EMBO J **25**(12): 2746-2756.
Cousin, X., C. Creminon, et al. (1996). "Acetylcholinesterase from Bungarus venom: a monomeric species." FEBS Lett **387**(2-3): 196-200.
Cousin, X., U. Strahle, et al. (2005). "Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models." Bioessays **27**(2): 189-200.
Coussen, F., A. Ayon, et al. (2001). "Addition of a glycophosphatidylinositol to acetylcholinesterase. Processing, degradation, and secretion." J Biol Chem **276**(30): 27881-27892.
Cowper, M. and L. H. Davidson (1943). "Phenacyl Bromide." Organic Syntheses **2**: 480-481.
Cutler, N. R., S. S. Jhee, et al. (1998). "Safety and tolerability of metrifonate in patients with Alzheimer's disease: results of a maximum tolerated dose study." Life Sci **62**(16): 1433-1441.
Darvesh, S., D. A. Hopkins, et al. (2003). "Neurobiology of butyrylcholinesterase." Nat Rev Neurosci **4**(2): 131-138.
Dauterman, W. C. (1971). "Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compounds." Bull World Health Organ **44**(1-3): 133-150.
Dawson, R. M. (1994). "Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning." J Appl Toxicol **14**(5): 317-331.
de Jong, L. P., M. A. Verhagen, et al. (1989). "The bispyridinium-dioxime HLo-7. A potent reactivator for acetylcholinesterase inhibited by the stereoisomers of tabun and soman." Biochem Pharmacol **38**(4): 633-640.
de Jong, L. P. and G. Z. Wolring (1984). "Stereospecific reactivation by some Hagedorn-oximes of acetylcholinesterases from various species including man, inhibited by soman." Biochem Pharmacol **33**(7): 1119-1125.
de Koning, M. C., M. J. Joosen, et al. (2011). "Peripheral site ligand-oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase." Bioorg Med Chem **19**(1): 588-594.
de Koning, M. C., M. van Grol, et al. (2011). "Peripheral site ligand conjugation to a non-quaternary oxime enhances reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase." Toxicol Lett **206**(1): 54-59.
De Luca, L., G. Giacomelli, et al. (2001). "An easy and convenient synthesis of Weinreb amides and hydroxamates." J Org Chem **66**(7): 2534-2537.
De Paolis, O., L. Teixeira, et al. (2009). "Synthesis of quinolines by a solid acid-catalyzed microwave-assisted domino cyclization–aromatization approach." Tetrahedron Letters **50**(24): 2939-2942.
de Silva, H. J., R. Wijewickrema, et al. (1992). "Does pralidoxime affect outcome of management in acute organophosphorus poisoning?" Lancet **339**(8802): 1136-1138.
Del Vecchio, P., M. Elias, et al. (2009). "Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus." Extremophiles **13**(3): 461-470.
Delvallee, G., J. Nigong, et al. (1991). "Étude hémodynamique des intoxications volontaires aiguës graves par insecticides organophosphorés (onze cas)." Réanim Soins intensifs Méd Urgence **7**(179-182).
Demar, J. C., E. D. Clarkson, et al. (2010). "Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases." Chem Biol Interact **187**(1-3): 191-198.
Demeshko, S., S. Dechert, et al. (2004). "Anion-pi interactions in a carousel copper(II)-triazine complex." J Am Chem Soc **126**(14): 4508-4509.

Desire, B. and S. Saint-Andre (1986). "Interaction of soman with beta-cyclodextrin." Fundam Appl Toxicol **7**(4): 646-657.
Dessau, M. A. and Y. Modis (2011). "Protein crystallization for X-ray crystallography." J Vis Exp(47).
Dinamarca, M. C., J. P. Sagal, et al. (2010). "Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Abeta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **5**: 4.
Dirnhuber, P., M. C. French, et al. (1979). "The protection of primates against soman poisoning by pretreatment with pyridostigmine." J Pharm Pharmacol **31**(5): 295-299.
diTargiani, R. C., L. Chandrasekaran, et al. (2010). "In search of a catalytic bioscavenger for the prophylaxis of nerve agent toxicity." Chem Biol Interact **187**(1-3): 349-354.
Doctor, B. P., D. W. Blick, et al. (1993). "Cholinesterases as scavengers for organophosphorus compounds: protection of primate performance against soman toxicity." Chem Biol Interact **87**(1-3): 285-293.
Dorandeu, F., G. Lallement, et al. (2003). Neuroprotection et neurotoxiques organophosphorés : quelle place pour la kétamine ? . Arnette. F. Rueil-Malmaison**:** 77-96.
Dori, A., G. Ifergane, et al. (2007). "Readthrough acetylcholinesterase in inflammation-associated neuropathies." Life Sci **80**(24-25): 2369-2374.
Draganov, D. I. (2010). "Lactonases with organophosphatase activity: structural and evolutionary perspectives." Chem Biol Interact **187**(1-3): 370-372.
Dumas, D. P., H. D. Durst, et al. (1990). "Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta." Arch Biochem Biophys **277**(1): 155-159.
Duysen, E. G., F. Koentgen, et al. (2011). "Production of ES1 Plasma Carboxylesterase Knockout Mice for Toxicity Studies." Chem Res Toxicol **24**(11): 1891-1898.
Dvir, H., D. M. Wong, et al. (2002). "3D structure of Torpedo californica acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 A resolution: kinetic and molecular dynamic correlates." Biochemistry **41**(9): 2970-2981.
Eddleston, M., N. A. Buckley, et al. (2008). "Management of acute organophosphorus pesticide poisoning." Lancet **371**(9612): 597-607.
Eddleston, M., A. Dawson, et al. (2004). "Early management after self-poisoning with an organophosphorus or carbamate pesticide - a treatment protocol for junior doctors." Crit Care **8**(6): R391-397.
Ekstrom, F., C. Akfur, et al. (2006). "Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase." Biochemistry **45**(1): 74-81.
Ekstrom, F., Y. P. Pang, et al. (2006). "Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates." Biochem Pharmacol **72**(5): 597-607.
Elias, M., J. Dupuy, et al. (2008). "Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities." J Mol Biol **379**(5): 1017-1028.
Ellman, G. L., K. D. Courtney, et al. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochem Pharmacol **7**: 88-95.
Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
Emsley, P., B. Lohkamp, et al. (2010). "Features and development of Coot." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 4): 486-501.
Ericsson, U. B., B. M. Hallberg, et al. (2006). "Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies." Anal Biochem **357**(2): 289-298.
Eyer, P., I. Hagedorn, et al. (1992). "HLo 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases." Arch Toxicol **66**(9): 603-621.

Fidder, A., A. G. Hulst, et al. (2002). "Retrospective detection of exposure to organophosphorus anti-cholinesterases: mass spectrometric analysis of phosphylated human butyrylcholinesterase." Chem Res Toxicol **15**(4): 582-590.
Fiser, A., R. K. Do, et al. (2000). "Modeling of loops in protein structures." Protein Sci **9**(9): 1753-1773.
Fleisher, J. H. and L. W. Harris (1965). "Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate." Biochem Pharmacol **14**(5): 641-650.
Fosbraey, P., J. R. Wetherell, et al. (1990). "Neurotransmitter changes in guinea-pig brain regions following soman intoxication." J Neurochem **54**(1): 72-79.
Frerot, E., J. Coste, et al. (1991). "PyBOP® and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α-dialkyl amino acid, Aib." Tetrahedron Letters **47**(2): 259-270.
Fujioka, K. and J. E. Casida (2007). "Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives." Chem Res Toxicol **20**(8): 1211-1217.
Fukuto, T. R. (1990). "Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides." Environ Health Perspect **87**: 245-254.
Gabel, F., P. Masson, et al. (2009). "Direct correlation between molecular dynamics and enzymatic stability: a comparative neutron scattering study of native human butyrylcholinesterase and its "aged" soman conjugate." Biophys J **96**(4): 1489-1494.
Gan, K. N., A. Smolen, et al. (1991). "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities." Drug Metab Dispos **19**(1): 100-106.
Garcia, G. E., A. J. Campbell, et al. (2010). "Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators." Chem Biol Interact **187**(1-3): 199-206.
Garcia-Ruiz, J. M., F. Otolora, et al. (2001). "Protein crystallization: A history of a supersaturation wave." J Crystal Growth **232**: 149-155.
Genovese, R. F., W. Sun, et al. (2010). "Safety of administration of human butyrylcholinesterase and its conjugates with soman or VX in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol **106**(5): 428-434.
Getman, D. K., J. H. Eubanks, et al. (1992). "The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7." Am J Hum Genet **51**(1): 170-177.
Geyer, B. C., L. Kannan, et al. (2010). "Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20251-20256.
Ghanem, E., Y. Li, et al. (2007). "Characterization of a phosphodiesterase capable of hydrolyzing EA 2192, the most toxic degradation product of the nerve agent VX." Biochemistry **46**(31): 9032-9040.
Ghanem, E. and F. M. Raushel (2005). "Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase." Toxicol Appl Pharmacol **207**(2 Suppl): 459-470.
Gilson, M. K., T. P. Straatsma, et al. (1994). "Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase." Science **263**(5151): 1276-1278.
Girard, E., V. Bernard, et al. (2007). "Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice." Life Sci **80**(24-25): 2380-2385.
Glynn, P. (1999). "Neuropathy target esterase." Biochem J **344 Pt 3**: 625-631.
Gnatt, A., D. Ginzberg, et al. (1991). "Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes." Cell Mol Neurobiol **11**(1): 91-104.
Goncharenko, S. B., M. M. Kaganskii, et al. (1992). "Ionization constants of the drugs amiridin and tacrine and their analogs." Pharmaceutical Chem J **26**(10): 769-772.
Goodsell, D. S., G. M. Morris, et al. (1996). "Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock." J Mol Recognit **9**(1): 1-5.

Gordon, J. J., L. Leadbeater, et al. (1978). "The protection of animals against organophosphate poisoning by pretreatment with a carbamate." Toxicol Appl Pharmacol **43**(1): 207-216.
Gotti, C., D. Fornasari, et al. (1997). "Human neuronal nicotinic receptors." Prog Neurobiol **53**(2): 199-237.
Green, A. L. and B. Saville (1956). "The reaction of oximes with isopropyl methylphosphono-fluoridate (Sarin)." Journal of the Chemical Society: 3887-3892.
Grimsley, J. K., B. Calamini, et al. (2005). "Structural and mutational studies of organophosphorus hydrolase reveal a cryptic and functional allosteric-binding site." Arch Biochem Biophys **442**(2): 169-179.
Grunwald, J., L. Raveh, et al. (1994). "Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity." Life Sci **54**(14): 991-997.
Haas, R., P. T. Brandt, et al. (1986). "Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase." Biochemistry **25**(11): 3098-3105.
Hajjar, N. P. and E. Hodgson (1980). "Flavin adenine dinucleotide--dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals." Science **209**(4461): 1134-1136.
Hallak, M. and E. Giacobini (1987). "A comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase." Neuropharmacology **26**(6): 521-530.
Halperin, I., B. Ma, et al. (2002). "Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions." Proteins **47**(4): 409-443.
Harel, M., I. Schalk, et al. (1993). "Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9031-9035.
Harel, M., C. T. Su, et al. (1991). "Refined crystal structures of "aged" and "non-aged" organophosphoryl conjugates of gamma-chymotrypsin." J Mol Biol **221**(3): 909-918.
Harel, M., J. L. Sussman, et al. (1992). "Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10827-10831.
Harris, J. M. and R. B. Chess (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 214-221.
Harris, L. W., D. R. Anderson, et al. (1990). "Evaluation of several oximes as reactivators of unaged soman-inhibited whole blood acetylcholinesterase in rabbits." Biochem Pharmacol **40**(12): 2677-2682.
Harris, L. W., J. H. Fleisher, et al. (1966). "Dealkylation and loss of capacity for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin." Science **154**(747): 404-407.
Hawwa, R., J. Aikens, et al. (2009). "Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from Geobacillus stearothermophilus." Arch Biochem Biophys **488**(2): 109-120.
Hawwa, R., S. D. Larsen, et al. (2009). "Structure-based and random mutagenesis approaches increase the organophosphate-degrading activity of a phosphotriesterase homologue from Deinococcus radiodurans." J Mol Biol **393**(1): 36-57.
Hess, B., C. Kutzner, et al. (2008). "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation " J Chem Theory Comput **4**: 435-447.
Hill, C. M., W. S. Li, et al. (2003). "Enhanced degradation of chemical warfare agents through molecular engineering of the phosphotriesterase active site." J Am Chem Soc **125**(30): 8990-8991.
Holm, L. and C. Sander (1997). "An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease." Proteins **28**(1): 72-82.
Hong, S. B. and F. M. Raushel (1996). "Metal-substrate interactions facilitate the catalytic activity of the bacterial phosphotriesterase." Biochemistry **35**(33): 10904-10912.
Hornak, V., R. Abel, et al. (2006). "Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters." Proteins **65**(3): 712-725.

Howard, A. S., R. Bucelli, et al. (2005). "Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures." Toxicol Appl Pharmacol **207**(2): 112-124.

Huang, Y. J., Y. Huang, et al. (2007). "Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13603-13608.

Hulme, E. C., N. J. Birdsall, et al. (1990). "Muscarinic receptor subtypes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **30**: 633-673.

Hunter, C. A., C. M. Low, et al. (2002). "Substituent effects on cation-pi interactions: a quantitative study." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 4873-4876.

Inestrosa, N. C., A. Alvarez, et al. (1996). "Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme." Neuron **16**(4): 881-891.

Ito, K. and J. Maruyama (1983). "Studies on Stable Diazoalkanes as Potential Fluorogenic Reagents. I. 7-Substituted 4-Diazomethylcoumarins." Chem Pharm Bull (Tokyo) **31**(9): 3014-3023.

Jackson, C. J., J. L. Foo, et al. (2008). "In crystallo capture of a Michaelis complex and product-binding modes of a bacterial phosphotriesterase." J Mol Biol **375**(5): 1189-1196.

Jacques, J. and A. Marquet (1988). "Selective α-bromination of an aralkyl ketone with phenyltrimethylammoium tribromide: 2-bromoacetyl-6-methoxynaphtalene and 2,2-dibromoacetyl-6-methoxynaphtalene." Organic Syntheses **6**.

Johnson, J. L., B. Cusack, et al. (2003). "Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate." Biochemistry **42**(18): 5438-5452.

Johnson, M. K. (1982). "Initiation of organophosphate-induced delayed neuropathy." Neurobehav Toxicol Teratol **4**(6): 759-765.

Joly, G. D. and E. N. Jacobsen (2004). "Thiourea-catalyzed enantioselective hydrophosphonylation of imines: practical access to enantiomerically enriched alpha-amino phosphonic acids." J Am Chem Soc **126**(13): 4102-4103.

Jun, D., L. Musilova, et al. (2010). "Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning." Chem Biol Interact **187**(1-3): 380-383.

Kabsch, W. (2010). "Xds." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 2): 125-132.

Kalisiak, J., E. C. Ralph, et al. (2011). "Amidine-oximes: reactivators for organophosphate exposure." J Med Chem **54**(9): 3319-3330.

Kangani, C. O., D. E. Kelley, et al. (2006). "One-pot synthesis of aldehydes or ketones from carboxylic acids via in situ generation of Weinreb amides using the Deoxo-Fluor reagent." Tetrahedron Letters **47**(35): 6289-6292.

Kaplan, D., D. Barak, et al. (2004). "Is aromaticity essential for trapping the catalytic histidine 447 in human acetylcholinesterase?" Biochemistry **43**(11): 3129-3136.

Kassa, J., J. Z. Karasova, et al. (2011). "A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of bispyridinium acetylcholinesterase reactivator KR-22934 with the oxime K203 and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice." Toxicol Mech Methods **21**(3): 241-245.

Kendrew, J. C., G. Bodo, et al. (1958). "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis." Nature **181**(4610): 662-666.

Khersonsky, O. and D. S. Tawfik (2005). "Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase." Biochemistry **44**(16): 6371-6382.

Khorana, H. G. (1954). "Arbodiimides : Part III. (A) A new method for the preparation of mixed esters of phosphoric acid. (B) Some observations on the base catalyzed addition of alcohols to carbodiimides." Canadian Journal of Chemistry **32**(3): 227-234.

Kiderlen, D., F. Worek, et al. (2000). "The phosphoryl oxime-destroying activity of human plasma." Arch Toxicol **74**(1): 27-32.
King, L. C. and G. K. Ostrum (1964). "Selective Bromination with Copper(II) Bromide1." J Org Chem **29**(12): 3459-3461.
Klinger, A. L., D. F. McComsey, et al. (2006). "Inhibition of carbonic anhydrase-II by sulfamate and sulfamide groups: an investigation involving direct thermodynamic binding measurements." J Med Chem **49**(12): 3496-3500.
Koblish, H. K., S. Zhao, et al. (2006). "Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo." Mol Cancer Ther **5**(1): 160-169.
Koca, J., C. G. Zhan, et al. (2003). "Coordination number of zinc ions in the phosphotriesterase active site by molecular dynamics and quantum mechanics." J Comput Chem **24**(3): 368-378.
Kostaropoulos, I., A. I. Papadopoulos, et al. (2001). "The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae)." Pest Manag Sci **57**(6): 501-508.
Kovarik, Z., A. L. Vrdoljak, et al. (2009). "Evaluation of oxime k203 as antidote in tabun poisoning." Arh Hig Rada Toksikol **60**(1): 19-26.
Krauss, M. (2001). "Ab initio structure of the active site of phosphotriesterase." J Chem Inf Comput Sci **41**(1): 8-17.
Kronman, C., A. Ordentlich, et al. (1994). "The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **269**(45): 27819-27822.
Kronman, C., B. Velan, et al. (1995). "Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation." Biochem J **311 (Pt 3)**: 959-967.
Kryger, G., M. Harel, et al. (2000). "Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 11): 1385-1394.
Kuca, K. and J. Cabal (2004). "In vitro reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase using new oximes--K027, K005, K033 and K048." Cent Eur J Public Health **12 Suppl**: S59-61.
Kuca, K., J. Cabal, et al. (2005). "Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE." J Appl Toxicol **25**(6): 491-495.
Kuo, C. L. and B. N. La Du (1998). "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity." Drug Metab Dispos **26**(7): 653-660.
Lallement, G., P. Carpentier, et al. (1993). "Transient impairment of the gabaergic function during initiation of soman-induced seizures." Brain Res **629**(2): 239-244.
Lallement, G., J. Veyret, et al. (1997). "Efficacy of huperzine in preventing soman-induced seizures, neuropathological changes and lethality." Fundam Clin Pharmacol **11**(5): 387-394.
Laumonnier, F., F. Bonnet-Brilhault, et al. (2004). "X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family." Am J Hum Genet **74**(3): 552-557.
Le Pla, R. C., K. J. Bowman, et al. (2006). "Phosphate alkylation in different DNA substrates: the role of local DNA sequence and electrophile character in determining the nonrandom nature of phosphotriester adduct formation." Chem Res Toxicol **19**(3): 407-413.
Le Provost, R., T. Wille, et al. (2011). "Optimized strategies to synthesize beta-cyclodextrin-oxime conjugates as a new generation of organophosphate scavengers." Org Biomol Chem **9**(8): 3026-3032.

Lengauer, T. and M. Rarey (1996). "Computational methods for biomolecular docking." Curr Opin Struct Biol **6**(3): 402-406.
Lenz, D. E., D. Yeung, et al. (2007). "Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review." Toxicology **233**(1-3): 31-39.
Leone, P., D. Comoletti, et al. (2010). "Structure-function relationships of the alpha/beta-hydrolase fold domain of neuroligin: a comparison with acetylcholinesterase." Chem Biol Interact **187**(1-3): 49-55.
Lev-Lehman, E., V. Deutsch, et al. (1997). "Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase." Blood **89**(10): 3644-3653.
Lev-Lehman, E., T. Evron, et al. (2000). "Synaptogenesis and myopathy under acetylcholinesterase overexpression." J Mol Neurosci **14**(1-2): 93-105.
Lherbet, C., R. Castonguay, et al. (2005). "Transesterification of trialkyl phosphates from alkyl bromides." Tetrahedron Letters **32**(20): 3565-3567.
Li, B., M. Sedlacek, et al. (2005). "Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma." Biochem Pharmacol **70**(11): 1673-1684.
Li, B., J. A. Stribley, et al. (2000). "Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse." J Neurochem **75**(3): 1320-1331.
Li, H., L. M. Schopfer, et al. (2008). "Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers." Biochem J **411**(2): 425-432.
Li, H., L. M. Schopfer, et al. (2007). "Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry." Toxicol Sci **100**(1): 136-145.
Li, W. S., K. T. Lum, et al. (2001). "Stereoselective detoxification of chiral sarin and soman analogues by phosphotriesterase." Bioorg Med Chem **9**(8): 2083-2091.
Li, Y., S. Camp, et al. (1993). "Tissue-specific expression and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene." J Biol Chem **268**(8): 5790-5797.
Lo, M. C., A. Aulabaugh, et al. (2004). "Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery." Anal Biochem **332**(1): 153-159.
Lockridge, O., R. M. Blong, et al. (1997). "A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase." Biochemistry **36**(4): 786-795.
Lopez-Arrieta, J. M. and L. Schneider (2006). "Metrifonate for Alzheimer's disease." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003155.
Luettringhaus, A. and I. Hagedorn (1964). "[Quaternary Hydroxyiminomethylpyridinium Salts. The Dischloride of Bis-(4-Hydroxyiminomethyl-1-Pyridinium-Methyl)-Ether (Lueh6), a New Reactivator of Acetylcholinesterase Inhibited by Organic Phosphoric Acid Esters]." Arzneimittelforschung **14**: 1-5.
Luo, C., C. Chambers, et al. (2010). "Mechanism for potent reactivation ability of H oximes analyzed by reactivation kinetic studies with cholinesterases from different species." Chem Biol Interact **187**(1-3): 185-190.
Luo, C., H. Leader, et al. (2003). "Two possible orientations of the HI-6 molecule in the reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase." Biochem Pharmacol **66**(3): 387-392.
Luo, C., A. Saxena, et al. (1999). "Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium." Biochemistry **38**(31): 9937-9947.
Luo, C., M. Tong, et al. (2007). "An in vitro comparative study on the reactivation of nerve agent-inhibited guinea pig and human acetylcholinesterases by oximes." Biochemistry **46**(42): 11771-11779.
Luo, C., M. Tong, et al. (2008). "Comparison of oxime reactivation and aging of nerve agent-inhibited monkey and human acetylcholinesterases." Chem Biol Interact **175**(1-3): 261-266.

Lynch, T. J., C. E. Mattes, et al. (1997). "Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase." Toxicol Appl Pharmacol **145**(2): 363-371.
Macilwain, C. (1993). "Study proves Iraq used nerve gas." Nature **363**(6424): 3.
Mack, A. and A. Robitzki (2000). "The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study." Prog Neurobiol **60**(6): 607-628.
Mallender, W. D., T. Szegletes, et al. (2000). "Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway." Biochemistry **39**(26): 7753-7763.
Mandrich, L., L. Merone, et al. (2010). "Hyperthermophilic phosphotriesterases/lactonases for the environment and human health." Environ Technol **31**(10): 1115-1127.
Manoguerra, A., C. Whitney, et al. (1995). "Cholinergic toxicity resulting from ocular instillation of echothiophate iodide eye drops." J Toxicol Clin Toxicol **33**(5): 463-465.
Marcel, V., L. G. Palacios, et al. (1998). "Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration." Biochem J **329 (Pt 2)**: 329-334.
Marrs, T. C., P. Rice, et al. (2006). "The role of oximes in the treatment of nerve agent poisoning in civilian casualties." Toxicol Rev **25**: 297-323.
Masson, P. (2011). "Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning." Toxicol Lett.
Masson, P., S. Adkins, et al. (1993). "Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant." J Biol Chem **268**(19): 14329-14341.
Masson, P., M. T. Froment, et al. (1996). "Asp7O in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase." Eur J Biochem **235**(1-2): 36-48.
Masson, P., M. T. Froment, et al. (2007). "Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase." Biochim Biophys Acta **1774**(1): 16-34.
Masson, P., P. Legrand, et al. (1997). "Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinyldithiocholine to human butyrylcholinesterase." Biochemistry **36**(8): 2266-2277.
Masson, P. and O. Lockridge (2010). "Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior." Arch Biochem Biophys **494**(2): 107-120.
Masson, P., F. Nachon, et al. (2008). "A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters." Chem Biol Interact **175**(1-3): 273-280.
Masson, P., W. Xie, et al. (1999). "Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates." Biochim Biophys Acta **1433**(1-2): 281-293.
Massoulie, J. (2002). "The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases." Neurosignals **11**(3): 130-143.
Massoulie, J., N. Perrier, et al. (2008). "Old and new questions about cholinesterases." Chem Biol Interact **175**(1-3): 30-44.
Massoulie, J., J. Sussman, et al. (1993). "Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase." Prog Brain Res **98**: 139-146.
Masters, C. L., G. Simms, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-4249.
Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.
Matulis, D., J. K. Kranz, et al. (2005). "Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor." Biochemistry **44**(13): 5258-5266.
Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(2): 560-564.

Maxwell, D. M., I. Koplovitz, et al. (2008). "A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents." Toxicol Appl Pharmacol **231**(2): 157-164.
Mazor, O., O. Cohen, et al. (2008). "Aging-resistant organophosphate bioscavenger based on polyethylene glycol-conjugated F338A human acetylcholinesterase." Mol Pharmacol **74**(3): 755-763.
McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
McPherson, A. (2004). "Introduction to protein crystallization." Methods **34**(3): 245-265.
Mercey, G., T. Verdelet, et al. (2011). "First efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of poisoned human acetylcholinesterase." Chem Commun (Camb) **47**(18): 5295-5297.
Merone, L., L. Mandrich, et al. (2010). "Improving the promiscuous nerve agent hydrolase activity of a thermostable archaeal lactonase." Bioresour Technol **101**(23): 9204-9212.
Merone, L., L. Mandrich, et al. (2005). "A thermostable phosphotriesterase from the archaeon Sulfolobus solfataricus: cloning, overexpression and properties." Extremophiles **9**(4): 297-305.
Mezer, E., N. Krivoy, et al. (1996). "Echothiophate iodide induced transient hyper- and hypothyroidism." J Glaucoma **5**(3): 191-192.
Mezzasalma, T. M., J. K. Kranz, et al. (2007). "Enhancing recombinant protein quality and yield by protein stability profiling." J Biomol Screen **12**(3): 418-428.
Michel, H. O., B. E. Hackley, Jr., et al. (1967). "Ageing and dealkylation of Soman (pinacolylmethylphosphonofluoridate)-inactivated eel cholinesterase." Arch Biochem Biophys **121**(1): 29-34.
Millard, C. B., G. Kryger, et al. (1999). "Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level." Biochemistry **38**(22): 7032-7039.
Millard, C. B., O. Lockridge, et al. (1995). "Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase." Biochemistry **34**(49): 15925-15933.
Millard, C. B., O. Lockridge, et al. (1998). "Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase." Biochemistry **37**(1): 237-247.
Mollerup, H. M. and M. R. Gatke (2011). "Butyrylcholinesterase gene mutations in patients with prolonged apnea after succinylcholine for electroconvulsive therapy." Acta Anaesthesiol Scand **55**(1): 82-86.
Morris, G. M., R. Huey, et al. (2008). "Using AutoDock for ligand-receptor docking." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 8**: Unit 8 14.
Muller, S., M. Koller, et al. (2011). "In vitro detoxification of cyclosarin (GF) by modified cyclodextrins." Toxicol Lett **200**(1-2): 53-58.
Murshudov, G. N., A. A. Vagin, et al. (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-255.
Nachon, F., E. Carletti, et al. (2011). "X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in the G117H mutant of human butyrylcholinesterase, a nerve agent target engineered into a catalytic bioscavenger." Biochem J **434**(1): 73-82.
Nachon, F., E. Carletti, et al. (2010). "Aging mechanism of butyrylcholinesterase inhibited by an N-methyl analogue of tabun: implications of the trigonal-bipyramidal transition state rearrangement for the phosphylation or reactivation of cholinesterases." Chem Biol Interact **187**(1-3): 44-48.
Nachon, F., L. Ehret-Sabatier, et al. (1998). "Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF." Biochemistry **37**(29): 10507-10513.

Nachon, F., Y. Nicolet, et al. (2002). "Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization." Eur J Biochem **269**(2): 630-637.
Nachon, F., J. Stojan, et al. (2008). "Insights into substrate and product traffic in the Drosophila melanogaster acetylcholinesterase active site gorge by enlarging a back channel." FEBS J **275**(10): 2659-2664.
Nahm, S. and S. M. Weinreb (1981). "N-methoxy-n-methylamides as effective acylating agents." Tetrahedron Letters **22**(39): 3815-3818.
Neville, L. F., A. Gnatt, et al. (1990). "Anionic site interactions in human butyrylcholinesterase disrupted by two single point mutations." J Biol Chem **265**(34): 20735-20738.
Newcomb, R. D., P. M. Campbell, et al. (1997). "A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7464-7468.
Novikov, B. N., J. K. Grimsley, et al. (2010). "Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol." J Control Release **146**(3): 318-325.
Nowlan, C., Y. Li, et al. (2006). "Resolution of chiral phosphate, phosphonate, and phosphinate esters by an enantioselective enzyme library." J Am Chem Soc **128**(49): 15892-15902.
Odzak, R., M. Calic, et al. (2007). "Evaluation of monoquaternary pyridinium oximes potency to reactivate tabun-inhibited human acetylcholinesterase." Toxicology **233**(1-3): 85-96.
Oldiges, H. and K. Schoene (1970). "[Pyridinium and imidazolium salts as antidotes for soman and paraoxon poisoning in mice]." Arch Toxikol **26**(4): 293-305.
Omburo, G. A., J. M. Kuo, et al. (1992). "Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase." J Biol Chem **267**(19): 13278-13283.
Omburo, G. A., L. S. Mullins, et al. (1993). "Structural characterization of the divalent cation sites of bacterial phosphotriesterase by 113Cd NMR spectroscopy." Biochemistry **32**(35): 9148-9155.
Ordentlich, A., D. Barak, et al. (1995). "Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase." J Biol Chem **270**(5): 2082-2091.
Ordentlich, A., D. Barak, et al. (1996). "The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors." J Biol Chem **271**(20): 11953-11962.
Ordentlich, A., D. Barak, et al. (1999). "Exploring the active center of human acetylcholinesterase with stereomers of an organophosphorus inhibitor with two chiral centers." Biochemistry **38**(10): 3055-3066.
Ordentlich, A., D. Barak, et al. (1993). "Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket." J Biol Chem **268**(23): 17083-17095.
Ordentlich, A., C. Kronman, et al. (1993). "Engineering resistance to 'aging' of phosphylated human acetylcholinesterase. Role of hydrogen bond network in the active center." FEBS Lett **334**(2): 215-220.
Otto, T. C., C. K. Harsch, et al. (2009). "Dramatic differences in organophosphorus hydrolase activity between human and chimeric recombinant mammalian paraoxonase-1 enzymes." Biochemistry **48**(43): 10416-10422.
Otto, T. C., S. A. Kasten, et al. (2010). "Purification and characterization of functional human paraoxonase-1 expressed in Trichoplusia ni larvae." Chem Biol Interact **187**(1-3): 388-392.

Pajoumand, A., S. Shadnia, et al. (2004). "Benefits of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides." Hum Exp Toxicol **23**(12): 565-569.
Paraoanu, L. E. and P. G. Layer (2008). "Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation." FEBS J **275**(4): 618-624.
Park, C. H. and R. S. Givens (1997). "New Photoactivated Protecting Groups. 6. p-Hydroxyphenacyl: A Phototrigger for Chemical and Biochemical Probes1,2." J Am Chem Soc **119**(10): 2453–2463.
Paterson, D. and A. Nordberg (2000). "Neuronal nicotinic receptors in the human brain." Prog Neurobiol **61**(1): 75-111.
Perrier, A. L., J. Massoulie, et al. (2002). "PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain." Neuron **33**(2): 275-285.
Perry, C. and H. Soreq (2004). "Organophosphate risk of leukemogenesis." Leuk Res **28**(9): 905-906.
Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.
Poyot, T., F. Nachon, et al. (2006). "Mutant of Bungarus fasciatus acetylcholinesterase with low affinity and low hydrolase activity toward organophosphorus esters." Biochim Biophys Acta **1764**(9): 1470-1478.
Pravst, I., M. Zupan, et al. (2006). "Directed regioselectivity of bromination of ketones with NBS: solvent-free conditions versus water." Tetrahedron Letters **47**: 4707-4710.
Puu, G. (1988). "Ketamine protects acetylcholinesterase against in vitro inhibition by sarin." Biochem Pharmacol **37**: 969-970.
Qian, N. and I. M. Kovach (1993). "Key active site residues in the inhibition of acetylcholinesterases by soman." FEBS Lett **336**(2): 263-266.
Quilliam, J. P. (1947). "Di-iso propylfluorophosphonate (DFP) its pharmacology and its therapeutic uses in glaucoma and myasthenia gravis." Postgrad Med J **23**(260): 280-282.
Radic, Z., J. Kalisiak, et al. (2010). "Interaction kinetics of oximes with native, phosphylated and aged human acetylcholinesterase." Chem Biol Interact **187**(1-3): 163-166.
Radic, Z., E. Reiner, et al. (1991). "Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives." Mol Pharmacol **39**(1): 98-104.
Radic, Z. and P. Taylor (2001). "Interaction kinetics of reversible inhibitors and substrates with acetylcholinesterase and its fasciculin 2 complex." J Biol Chem **276**(7): 4622-4633.
Raushel, F. M. (2002). "Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents." Curr Opin Microbiol **5**(3): 288-295.
Raushel, F. M. (2011). "Chemical biology: Catalytic detoxification." Nature **469**(7330): 310-311.
Raveh, L., J. Grunwald, et al. (1993). "Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization." Biochem Pharmacol **45**(12): 2465-2474.
Raves, M. L., M. Harel, et al. (1997). "Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A." Nat Struct Biol **4**(1): 57-63.
Reichert, R. W. and M. B. Shields (1991). "Intraocular pressure response to the replacement of pilocarpine or carbachol with echothiophate." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **229**(3): 252-253.
Reiter, G., J. Mikler, et al. (2008). "Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **873**(1): 86-94.
Riotte, M., M. Vacquier, et al. (1988). Un anticonvulsivant efficace en urgence contre l'intoxication par les organophosphorés, SSA Travaux Scientifiques. **9:** 115-116.
Rochu, D., E. Chabriere, et al. (2007). "Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning." Toxicology **233**(1-3): 47-59.

Rochu, D., N. Viguie, et al. (2004). "Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence." Biochem J **380**(Pt 3): 627-633.
Roger, R. and D. G. Neilson (1961). "The chemistry of imidates." Chem Rev **61**(2): 179-211.
Ronco, C., R. Foucault, et al. (2011). "New huprine derivatives functionalized at position 9 as highly potent acetylcholinesterase inhibitors." ChemMedChem **6**(5): 876-888.
Ronco, C., G. Sorin, et al. (2009). "Synthesis and structure-activity relationship of Huprine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors." Bioorg Med Chem **17**(13): 4523-4536.
Rosenberry, T. L., W. D. Mallender, et al. (1999). "A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate." Chem Biol Interact **119-120**: 85-97.
Rousseau, J. M., I. Besse Bardot, et al. (2009). "[Interest of Ineurope syringe for nerve agent intoxication]." Ann Fr Anesth Reanim **28**(5): 482-488.
Russell, W. L., E. M. Kelly, et al. (1979). "Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5818-5819.
Samples, C. R., F. M. Raushel, et al. (2007). "Activation of the binuclear metal center through formation of phosphotriesterase-inhibitor complexes." Biochemistry **46**(11): 3435-3442.
Sanner, M. F. (1999). "Python: a programming language for software integration and development." J Mol Graph Model **17**(1): 57-61.
Sanson, B., J. P. Colletier, et al. (2011). "Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations." Protein Sci **20**(7): 1114-1118.
Sanson, B., F. Nachon, et al. (2009). "Crystallographic snapshots of nonaged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugate with pralidoxime." J Med Chem **52**(23): 7593-7603.
Saridakis, E. E., P. D. Stewart, et al. (1994). "Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 3): 293-297.
Saxena, A., Y. Ashani, et al. (1998). "Role of oligosaccharides in the pharmacokinetics of tissue-derived and genetically engineered cholinesterases." Mol Pharmacol **53**(1): 112-122.
Saxena, A., W. Sun, et al. (2011). "Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX." Biochem Pharmacol **81**(1): 164-169.
Scholl, F. G. and P. Scheiffele (2003). "Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS." Trends Neurosci **26**(11): 618-624.
Schopfer, L. M., C. E. Furlong, et al. (2010). "Development of diagnostics in the search for an explanation of aerotoxic syndrome." Anal Biochem **404**(1): 64-74.
Schottel, B. L., H. T. Chifotides, et al. (2008). "Anion-pi interactions." Chem Soc Rev **37**(1): 68-83.
Schuttelkopf, A. W. and D. M. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 8): 1355-1363.
Segall, Y., D. Waysbort, et al. (1993). "Direct observation and elucidation of the structures of aged and nonaged phosphorylated cholinesterases by 31P NMR spectroscopy." Biochemistry **32**(49): 13441-13450.
Shafferman, A., A. Ordentlich, et al. (1996). "Aging of phosphylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre." Biochem J **318 (Pt 3)**: 833-840.
Shafferman, A., B. Velan, et al. (1992). "Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center." EMBO J **11**(10): 3561-3568.

Sharma, K. V., C. Koenigsberger, et al. (2001). "Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth." J Neurosci Res **63**(2): 165-175.
Shembekar, V. R., Y. Chen, et al. (2005). "A protecting group for carboxylic acids that can be photolyzed by visible light." Biochemistry **44**(19): 7107-7114.
Shih, T. M. and J. H. McDonough, Jr. (1997). "Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures." J Appl Toxicol **17**(4): 255-264.
Skwarczynski, M. and P. Kafarski (1995). "Alkylation of potassium 1-(N-Benzyloxycarbonylamino)alkylphosphonates and Phosphinates in the Presence of 18-Crown-6." Synthetic Communications **25**(22): 3565-3571.
Small, D. H., G. Reed, et al. (1995). "Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture." J Neurosci **15**(1 Pt 1): 144-151.
Soreq, H. and S. Seidman (2001). "Acetylcholinesterase--new roles for an old actor." Nat Rev Neurosci **2**(4): 294-302.
Sousa da Silva, A. W., W. F. Vranken, et al. (2010). acpype - AnteChamber PYthon Parser interfacE. to be submitted.
Su, C. T., P. H. Wang, et al. (1986). "Kinetic studies and structure-activity relationships of bispyridinium oximes as reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds." Fundam Appl Toxicol **6**(3): 506-514.
Surrey, A. R. and H. F. Hammer (1946). "Some 7-substituted 4-aminoquinoline derivatives." J Am Chem Soc **68**: 113-116.
Sussman, J. L., M. Harel, et al. (1991). "Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein." Science **253**(5022): 872-879.
Suzuki, S. M., R. C. Stevens, et al. (2010). "Engineering human PON1 in an E. coli expression system." Adv Exp Med Biol **660**: 37-45.
Sweeney, R. E. and D. M. Maxwell (2003). "A theoretical expression for the protection associated with stoichiometric and catalytic scavengers in a single compartment model of organophosphorus poisoning." Math Biosci **181**(2): 133-143.
Szegletes, T., W. D. Mallender, et al. (1999). "Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect." Biochemistry **38**(1): 122-133.
Talbot, B. G., D. R. Anderson, et al. (1988). "A comparison of in vivo and in vitro rates of aging of soman-inhibited erythrocyte acetylcholinesterase in different animal species." Drug Chem Toxicol **11**(3): 289-305.
Tenberken, O., H. Thiermann, et al. (2010). "Chromatographic preparation and kinetic analysis of interactions between tabun enantiomers and acetylcholinesterase." Toxicol Lett **195**(2-3): 142-146.
Terrier, F., P. Rodriguez-Dafonte, et al. (2006). "Revisiting the reactivity of oximate alpha-nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of sarin, soman and DFP under mild conditions." Org Biomol Chem **4**(23): 4352-4363.
Thiermann, H., L. Szinicz, et al. (1999). "Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning." Toxicol Lett **107**(1-3): 233-239.
Toutant, J. P., M. Arpagaus, et al. (1988). "Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult Drosophila melanogaster: quaternary structure and hydrophobic character." J Neurochem **50**(1): 209-218.
Trott, O. and A. J. Olson (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." J Comput Chem **31**(2): 455-461.
Trovaslet-Leroy, M., L. Musilova, et al. (2011). "Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents." Toxicol Lett **206**(1): 14-23.
Tsai, P. C., A. Bigley, et al. (2010). "Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase." Biochemistry **49**(37): 7978-7987.

Tsai, P. C., Y. Fan, et al. (2010). "Structural determinants for the stereoselective hydrolysis of chiral substrates by phosphotriesterase." Biochemistry **49**(37): 7988-7997.
Vagin, A. and A. Teplyakov (2010). "Molecular replacement with MOLREP." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 1): 22-25.
Vale, J. A. (1998). "Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning." Toxicol Lett **102-103**: 649-652.
Vanhooke, J. L., M. M. Benning, et al. (1996). "Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate." Biochemistry **35**(19): 6020-6025.
Vanquelef, E., S. Simon, et al. (2011). "R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments." Nucleic Acids Res **39**(Web Server issue): W511-517.
Velan, B., C. Kronman, et al. (1993). "N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis." Biochem J **296 (Pt 3)**: 649-656.
Wang, B. S., H. Wang, et al. (2009). "Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis." J Neural Transm **116**(4): 457-465.
Wang, J., W. Wang, et al. (2006). "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations." J Mol Graph Model **25**(2): 247-260.
Wang, J., R. M. Wolf, et al. (2004). "Development and testing of a general amber force field." J Comput Chem **25**(9): 1157-1174.
Wang, N. N., L. Yuan, et al. (2011). "Effect of PON1 on dichlorvos toxicokinetics." Emerg Med J **28**(4): 313-315.
Watson, A. D., J. A. Berliner, et al. (1995). "Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein." J Clin Invest **96**(6): 2882-2891.
Williams, D. G. (1983). "Intramolecular group transfer is a characteristic of neurotoxic esterase and is independent of the tissue source of the enzyme. A comparison of the aging behaviour of di-isopropyl phosphorofluoridate-labelled proteins in brain, spinal cord, liver, kidney and spleen from hen and in human placenta." Biochem J **209**(3): 817-829.
Winn, M. D., C. C. Ballard, et al. (2011). "Overview of the CCP4 suite and current developments." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 235-242.
Wolfe, A. D., R. S. Rush, et al. (1987). "Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxicity." Fundam Appl Toxicol **9**(2): 266-270.
Wong, K. Y. and J. Gao (2007). "The reaction mechanism of paraoxon hydrolysis by phosphotriesterase from combined QM/MM simulations." Biochemistry **46**(46): 13352-13369.
Wong, L., Z. Radic, et al. (2000). "Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis." Biochemistry **39**(19): 5750-5757.
Worek, F., N. Aurbek, et al. (2007). "Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates." Biochem Pharmacol **73**(11): 1807-1817.
Worek, F., N. Aurbek, et al. (2008). "Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: pig versus minipig acetylcholinesterase." Toxicology **244**(1): 35-41.
Worek, F., N. Aurbek, et al. (2011). "Kinetic analysis of interactions of paraoxon and oximes with human, Rhesus monkey, swine, rabbit, rat and guinea pig acetylcholinesterase." Toxicol Lett **200**(1-2): 19-23.
Worek, F., P. Eyer, et al. (2007). "Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis." Toxicol Appl Pharmacol **219**(2-3): 226-234.
Worek, F., P. Eyer, et al. (2000). "Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase." Arch Toxicol **74**(1): 21-26.

Worek, F., P. Eyer, et al. (1998). "Inhibition, reactivation and aging kinetics of cyclohexylmethylphosphonofluoridate-inhibited human cholinesterases." Arch Toxicol **72**(9): 580-587.
Worek, F., M. Koller, et al. (2005). "Diagnostic aspects of organophosphate poisoning." Toxicology **214**(3): 182-189.
Worek, F., G. Reiter, et al. (2002). "Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates." Arch Toxicol **76**(9): 523-529.
Worek, F., L. Szinicz, et al. (2005). "Evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning: development of a kinetic-based dynamic model." Toxicol Appl Pharmacol **209**(3): 193-202.
Worek, F., H. Thiermann, et al. (2004). "Reactivation and aging kinetics of human acetylcholinesterase inhibited by organophosphonylcholines." Arch Toxicol **78**(4): 212-217.
Worek, F., H. Thiermann, et al. (2004). "Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes." Biochem Pharmacol **68**(11): 2237-2248.
Worek, F., T. Wille, et al. (2010). "Reactivation of organophosphate-inhibited human, Cynomolgus monkey, swine and guinea pig acetylcholinesterase by MMB-4: a modified kinetic approach." Toxicol Appl Pharmacol **249**(3): 231-237.
Xing, R.-L., L. Pan, et al. (2010). "A practical and efficient procedure for the α-bromination of arylethanones." Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences **19**: 400-402.
Xue, L., M. C. Ko, et al. (2011). "Design, preparation, and characterization of high-activity mutants of human butyrylcholinesterase specific for detoxification of cocaine." Mol Pharmacol **79**(2): 290-297.
Zakharkin, L. I. and I. M. Khorlina (1962). "Reduction of esters of carboxylic acids into aldehydes with diisobutylaluminium hydride." Tetrahedron Letters **3**(14): 619-620.
Zhang, C., J. M. Milunsky, et al. (2009). "A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export." J Neurosci **29**(35): 10843-10854.
Zhang, X., R. Wu, et al. (2009). "Molecular dynamics simulations of the detoxification of paraoxon catalyzed by phosphotriesterase." J Comput Chem **30**(15): 2388-2401.
Zhou, Q. and K. D. Turnbull (2001). "Quinone methide phosphodiester alkylations under aqueous conditions." J Org Chem **66**(21): 7072-7077.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Marielle WANDHAMMER

Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés

—

Stratégie de réactivation

Les pesticides et toxiques de guerre organophosphorés sont responsables d'intoxications qui se révèlent préoccupantes pour les autorités sanitaires. La recherche de solutions thérapeutiques pour pallier le manque de moyens efficaces pour contrer ces intoxications apparaît comme essentielle. L'acétylcholinestérase (AChE), enzyme de régulation de l'influx nerveux, en est la cible principale.

Au cours de cette thèse, nous avons, d'une part, mis en place une stratégie de conception de molécules capables de réactiver les cholinestérases dites vieillies. Dans ce but, plusieurs dizaines de molécules ont été conçues et synthétisées. Leur évaluation *in silico* par docking moléculaire et *in vitro* par mesure d'affinité pour l'enzyme et par étude cristallographique n'a pas permis d'obtenir la réalkylation espérée, mais ce travail nous a offert quelques nouvelles perspectives.

D'autre part, nos travaux de cristallographie de l'inhibition de la butyrylcholinestérase humaine par les agents V et le sarin montrent que cette cholinestérase a une énantiosélectivité altérée pour ces inhibiteurs chiraux par rapport à l'AChE humaine. Ceci implique la nécessité de quantités d'enzyme plus importantes pour atteindre la capacité protectrice désirée et donc un surcoût non négligeable. L'AChE humaine serait finalement un bioépurateur de neurotoxiques organophosphorés économiquement plus viable.

Mots-clés *: réactivateurs, acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase, neurotoxiques organophosphorés, inhibition, cristallographie, énantiosélectivité, bioépurateurs.*

Organophosphate pesticides and chemical warfare are responsible for poisoning that pose to health security issues. The research of therapeutic solutions to overcome the lack of effective means to counter these poisonings is essential. Acetylcholinesterase (AChE), the enzyme involved in the regulation of nerve impulses, is the main target.

In this thesis, we have, first, set up a strategy for designing molecules that can reactivate aged cholinesterases. To this purpose, several dozen molecules have been designed and synthesized. Evaluation *in silico* by molecular docking and *in vitro* by measuring affinity for the enzyme and crystallographic study did not observe the desired realkylation. But this work opened new perspectives.

Secondly, our crystallographic work on the inhibition of human butyrylcholinesterase by V-agents and sarin shows that cholinesterase has altered enantioselectivity for these chiral inhibitors of human AChE. This implies that larger amounts of enzyme are required for the desired protection and thus, a significant additional cost. Human AChE seems finally a more suitable neurotoxic bioscavenger.

Key words*: reactivators, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, organophosphate neurotoxics, inhibition, crystallography, enantioselectivity, bioscavengers*