

ETUDE MICROCALORIMETRIQUE DE L'INHIBITION DE LA CHOLINESTERASE PAR QUELQUES PHOSPHORAMIDES ALIPHATIQUES

JEAN DEBORD, MICHEL LABADIE

Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, 87032 Limoges Cédex (France)

JEAN-CLAUDE BOLLINGER et THEOPHILE YVERNAULT

Laboratoire de Chimie Générale et Analytique, Faculté des Sciences, 87060 Limoges Cédex (France)

(Reçu le 16 février 1983)

ABSTRACT

Flow microcalorimetry is applied to the determination of kinetic inhibition constants of cholinesterase by some organophosphorus compounds. Experimental data, treated with the integrated Michaelis–Menten equation, showed that the 9 aliphatic phosphoramides studied

here (OPXYZ with X, Y, Z = NMe₂; NEt₂; ;  or ) behave according to a competitive scheme; they are, however, weak inhibitors.

RESUME

On a utilisé la microcalorimétrie d'écoulement pour déterminer les constantes cinétiques d'inhibition de la cholinestérase par quelques composés organophosphorés. Les données expérimentales, traitées selon l'équation de Michaelis–Menten intégrée, montrent que les 9 phosphoramides aliphatiques étudiés ici (OPXYZ avec X, Y, Z = NMe₂; NEt₂; ;

 ou ) agissent selon un mécanisme compétitif; cependant, ce sont tous de faibles inhibiteurs.

INTRODUCTION

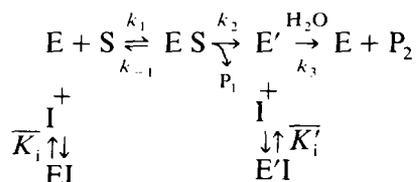
Les propriétés anticholinestérasiques des organophosphorés sont à la base de leur utilisation comme insecticides [1]. La détermination des constantes d'inhibition de la cholinestérase est habituellement effectuée par spectrophotométrie ou par potentiométrie [1]. Plus récemment des méthodes thermiques

telles que la microcalorimétrie [2,3] ou l'enthalpimétrie [4] ont été utilisées. Rappelons que l'enthalpimétrie mesure la quantité de chaleur dégagée dans un récipient adiabatique [5] alors que la microcalorimétrie mesure le débit de chaleur (puissance thermique) à travers une paroi conductrice [6].

Dans la présente communication, nous rapportons la détermination des constantes d'inhibition de la cholinestérase sérique par une série de phosphoramides aliphatiques du type de l'hexaméthylphosphotriamide (HMPT). Les mesures sont effectuées par microcalorimétrie d'écoulement avec utilisation d'équations de vitesse intégrées, selon une méthode récemment introduite par Eftink et al. [7].

PARTIE THEORIQUE

L'inhibition réversible de la cholinestérase (ChE) peut être représentée par le schéma [8]



où E = enzyme, S = substrat (ester), E' = acyl enzyme, P₁, P₂ = produits (P₁ alcool, P₂ acide), I = inhibiteur, \bar{K}_i , \bar{K}'_i = constantes de formation, auquel correspond l'équation de vitesse générale [9]

$$v = -\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt} = \frac{V_s}{K_m(1 + i\bar{K}_i) + s[1 + i\bar{K}'_i\{k_2/(k_2 + k_3)\}]} \quad (1)$$

où v = vitesse de réaction pour les concentrations s en substrat, p en produits de réaction, i en inhibiteur, e_0 en enzyme, V = vitesse maximale = $[k_2 k_3 / (k_2 + k_3)]e_0$, K_m = constante de Michaelis = $k_3(k_{-1} + k_2) / k_1(k_2 + k_3)$, avec les quatre cas particuliers

- $\bar{K}'_i = 0$ inhibition compétitive
- $\bar{K}_i = 0$ inhibition incompétitive
- $\bar{K}_i = \bar{K}'_i$ inhibition non compétitive
- \bar{K}_i et $\bar{K}'_i \neq 0$ inhibition mixte

Pour les substrats tels que l'acétyl ou la butyrylcholine, on peut admettre que $k_2 \gg k_3$ [8] de sorte que le terme $\bar{K}'_i[k_2/(k_2 + k_3)]$ se réduit pratiquement à \bar{K}'_i .

- La validité de cette équation de vitesse est tributaire des approximations
- (a) les processus écrits horizontalement sont à l'état stationnaire;
 - (b) les processus écrits verticalement sont à l'état d'équilibre;

(c) la concentration de l'enzyme est faible par rapport à celles du substrat et de l'inhibiteur;

(d) la concentration du substrat est suffisamment faible pour que l'on puisse négliger le phénomène d'activation par excès de substrat, dû à la fixation d'une deuxième molécule de substrat sur l'acyl-enzyme [8].

En microcalorimétrie d'écoulement on mesure la puissance thermique w dégagée lors du mélange d'une solution de substrat (contenant éventuellement l'inhibiteur) et d'une solution d'enzyme; on en déduit la concentration p du produit formé pendant le temps τ mis par le mélange pour traverser la cellule de mesure

$$p = \frac{w}{f\Delta H} \quad (2)$$

où f désigne le débit total des solutions et ΔH l'enthalpie de réaction.

La relation entre p et les paramètres cinétiques s'obtient en intégrant l'équation différentielle (1) entre les instants 0 ($p = 0$; $s = s_0$) et τ ($s = s_0 - p$).

$$(1 + i\overline{K}_i)p - K_m(1 + i\overline{K}_i) \ln\left(1 - \frac{p}{s_0}\right) = V\tau \quad (3)$$

ΔH est mesuré lors d'une série d'expériences conduites avec un excès d'enzyme, de sorte que tout le substrat soit hydrolysé pendant la traversée de la cellule; on a alors $p = s_0$ d'où

$$\Delta H = \frac{w}{fs_0} \quad (4)$$

Dans le cas des inhibiteurs compétitifs, nous avons mis au point une technique simplifiée permettant de déterminer la constante d'inhibition \overline{K}_i en utilisant seulement deux mesures (à condition de connaître K_m):

(a) une mesure sans inhibiteur

$$p - K_m \ln\left(1 - \frac{p}{s_0}\right) = V\tau \quad (5)$$

(b) une mesure avec inhibiteur, les concentrations en enzyme et substrat restant les mêmes

$$p' - K_m(1 + i\overline{K}_i) \ln\left(1 - \frac{p'}{s_0}\right) = V\tau \quad (6)$$

On en déduit

$$\overline{K}_i = \frac{1}{i} \left[\frac{p' - p + K_m \ln\left[1 - \left(\frac{p}{s_0}\right)\right]}{K_m \ln\left[1 - \left(\frac{p'}{s_0}\right)\right]} - 1 \right] \quad (7)$$

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et réactifs

Microcalorimètre à circulation LKB "Flow" No. 10700-1, réglé à 30°C, perfusé par de l'eau thermostatée à $(23 \pm 0,1)$ °C et placé dans un local thermostaté à (25 ± 1) °C.

Les solutions de réactifs sont introduites dans la cellule de mélange de l'instrument à l'aide d'une pompe péristaltique Gilson Minipuls II à deux canaux donnant des débits identiques ($f \approx 20-30$ ml h⁻¹; $\tau \approx 60-90$ s).

Le signal délivré par les thermocouples est amplifié par un microvoltmètre amplificateur Keithley 150 B (réglé sur la sensibilité 30 μ V) et appliqué à un enregistreur LKB.

L'appareil est étalonné soit par étalonnage électrique à l'aide des résistances étalons montées dans les cellules, soit par étalonnage chimique à l'aide de la chaleur de protonation du Tris [10].

– Tampon constitué par une solution à 0,1 M de Tris (Merck 8382) amenée à pH 7,4 avec HCl concentré. Ce tampon constitue le solvant de toutes les solutions qui vont être décrites.

– Iodure de butyrylthiocholine (BuSCh, Sigma B 3253)

– Butyrylcholinestérase de sérum de cheval (BuChE, Sigma type IV-S, C7512).

– Hexaméthylphosphotriamide (HMPT), Prolabo purifié selon [19].

– Les autres phosphoramides ont été préparés et purifiés selon les méthodes précédemment décrites [11].

– Les calculs sont effectués sur des calculateurs Hewlett-Packard HP41C et HP85 à l'aide de programmes développés au Laboratoire et disponibles auprès des auteurs.

Mesure de la chaleur d'hydrolyse de la butyrylthiocholine

On mesure la puissance dégagée lors du mélange d'une solution de BuChE (1 g l⁻¹) avec des solutions de BuSCh de concentrations croissantes (0,2–2 mM). Les chaleurs de dilution des réactifs s'étant avérées négligeables, la puissance mesurée est entièrement due à la réaction enzymatique.

Les résultats obtenus (Fig. 1) montrent que la relation (4) est vérifiée pour des valeurs de s_0 (concentration dans le mélange réactionnel) inférieures à 1 mM; on en déduit la valeur de $\Delta H = (-60,6 \pm 1,2)$ kJ mole⁻¹

Etude du mécanisme d'inhibition de la ChE par HMPT

On mesure la puissance dégagée lors du mélange d'une solution de BuChE (0,1 g l⁻¹) et d'une solution de BuSCh (0,2–2 mM) contenant éventuellement HMPT (28,4 mM); la ligne de base est effectuée sur le mélange Tris + Tris

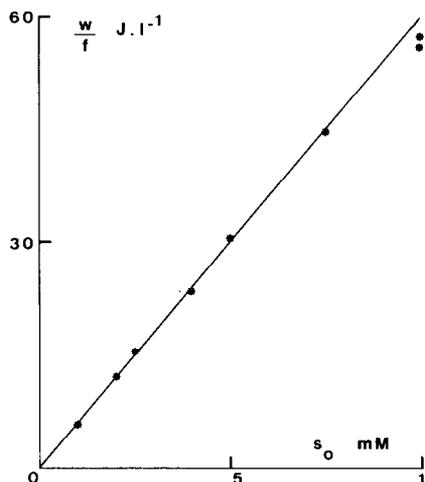


Fig. 1. Détermination de la chaleur d'hydrolyse de la butyrylthiocholine.

dans le cas des mesures sans inhibiteur et sur le mélange Tris + solution de substrat et d'inhibiteur dans le cas des mesures avec inhibiteur (ceci permet de tenir compte de la chaleur de dilution de HMPT).

On ajuste ensuite aux données expérimentales (valeurs de p en fonction de s_0 et i) les équations de vitesse intégrées correspondant aux quatre mécanismes d'inhibition précédemment décrits, en utilisant la méthode des moindres carrés non linéaires [12] associée à la résolution numérique de l'équation (3) par la méthode de Newton-Raphson.

On constate (Tableau 1) que le meilleur ajustement est obtenu avec le mécanisme d'inhibition compétitive (le mécanisme mixte donne aussi un bon ajustement mais la valeur de \overline{K}_i n'est pas significative).

On conclut donc que le HMPT est un inhibiteur compétitif de la ChE, avec les paramètres cinétiques figurant dans le Tableau 1.

Mesure de la constante d'inhibition compétitive pour divers phosphoramides

Pour les composés ayant une structure voisine de celle de HMPT on peut admettre que l'inhibition est également compétitive; on applique alors la méthode calorimétrique simplifiée en mélangeant une solution de BuChE ($0,1 \text{ g l}^{-1}$) avec une solution de BuSCh à 2 mM contenant éventuellement l'inhibiteur à une concentration suffisante pour réduire la puissance mesurée d'environ 50%. Afin de tenir compte de la chaleur de dilution des inhibiteurs, la ligne de base est établie comme dans le cas du HMPT.

L'application de la relation (7) permet alors le calcul de \overline{K}_i en utilisant la valeur de K_m trouvée précédemment (Tableau 1).

Les résultats sont regroupés dans le Tableau 2, par ordre de pouvoir inhibiteur croissant.

TABLEAU 1

Ajustement des équations de vitesse intégrées correspondant aux différents mécanismes d'inhibition dans le cas du HMPT
(Résultats sous forme moyenne \pm écart-type; 8 points expérimentaux.)

Mécanisme	Paramètres				Variance résiduelle $\times 10^5$ (mmole ² l ⁻²)
	V (mmole l ⁻¹ min ⁻¹)	K_m (mmole l ⁻¹)	\bar{K}_i (l mmole ⁻¹)	\bar{K}_i' (l mmole ⁻¹)	
Compétitif	0,327 \pm 0,012	0,376 \pm 0,037	0,162 \pm 0,015		1,54
Incompétitif	0,364 \pm 0,055	0,502 \pm 0,172		0,103 \pm 0,026	17,5
Non compétitif	0,350 \pm 0,026	0,451 \pm 0,078	0,0588 \pm 0,0068		5,11
Mixte	0,330 \pm 0,013	0,384 \pm 0,039	0,137 \pm 0,027	0,013 \pm 0,013	1,55

TABLEAU 2

Constantes d'inhibition compétitive \bar{K}_i pour divers phosphoramides

Composé	\bar{K}_i (mmole ⁻¹ l)
OP(NMe ₂) ₂ (N )	0,13
OP(NMe ₂) ₃	0,17
OP(NMe ₂) ₂ (NEt ₂)	0,30
OP(N ) ₃	1,2
OP(NMe ₂) ₂ (N )	1,3
OP(NEt ₂) ₃	1,6
OP(NEt ₂) ₂ (N )	2,2
OP(NEt ₂)(N ) ₂	3,1
OP(N ) ₃	5,5

DISCUSSION

La présente étude montre que la microcalorimétrie d'écoulement est susceptible de fournir à la fois les paramètres thermochimiques et cinétiques des réactions enzymatiques. Nous confirmons donc les résultats des études précédentes [7,13].

La précision de la mesure de ΔH est d'environ 2%, ce qui est acceptable étant donné les faibles quantités de chaleur mesurées. Cette précision est comparable à celle de la méthode enthalpimétrie [14].

L'enthalpie globale d'hydrolyse en tampon Tris est plus forte pour la butyrylthiocholine ($-60,6$ kJ mole⁻¹) que pour la butyrylcholine ($-46,1$ kJ mole⁻¹, [14]); ceci semble dû à l'ionisation de la fonction thiol de la thiocholine formée, $pK_a = 7,80$ [15]; ce phénomène augmente la sensibilité de la méthode calorimétrique et rend la butyrylthiocholine préférable à la butyrylcholine pour l'étude calorimétrique de la cholinestérase.

La détermination calorimétrique des paramètres cinétiques (V , K_m , \bar{K}_i) est moins précise que celle de ΔH . Bien que l'incertitude observée (5–10%) soit de l'ordre de celles habituellement rencontrées en cinétique enzymatique, trois raisons peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.

(1) La nécessité de travailler avec des concentrations en substrat échelonnées de part et d'autre du K_m , ce qui limite l'importance des effets thermiques mesurés.

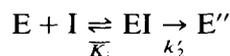
(2) L'utilité de limiter le pourcentage de substrat hydrolysé dans la cellule (donc la valeur de p) afin d'éviter une éventuelle inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction.

Dans nos conditions le pourcentage de substrat hydrolysé (rapport p/s_0) n'excédait pas 50%, et nous n'avons pas observé d'amélioration de l'ajustement des équations de vitesse après avoir ajouté des termes correctifs tenant compte d'une inhibition par les produits. Nous avons donc considéré ce phénomène comme négligeable.

(3) L'importance des chaleurs de dilution de ces inhibiteurs, souvent comparables à celle de la réaction enzymatique.

La valeur obtenue pour K_m (0,38 mM) diffère nettement de celle observée par Tan et Grime [4] lors de l'étude enthalpimétrique de l'hydrolyse à pH = 8 de la butyrylcholine ($K_m = 1,70$ mM). Les différences de pH du milieu réactionnel et de structure des substrats ne semblent pas pouvoir suffire à expliquer l'écart observé. Il faut noter que Tan et Grime utilisent des concentrations en substrat environ 10 fois plus fortes que les nôtres; or il est connu [8] que la cholinestérase présente un phénomène d'activation par excès de substrat, ce qui a pour effet d'augmenter la valeur apparent du K_m ; c'est pour éviter ce phénomène que nous avons limité à 1 mM les concentrations en substrat utilisées dans ce travail.

Après avoir établi que le HMPT était un inhibiteur compétitif nous avons admis qu'il en était de même pour les autres phosphoramides étudiés. Les valeurs de \bar{K}_i sont en accord avec celles habituellement rencontrées pour les inhibiteurs phosphorés de la cholinestérase [1]. Il faut cependant noter que les organophosphorés utilisés comme insecticides agissent selon un mécanisme d'inhibition irréversible



où E'' est une phosphoryl enzyme.

Dans le cas des produits utilisés dans ce travail nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage d'inhibition après incubation de l'inhibiteur avec l'enzyme préalablement à l'introduction du substrat. Il s'agit donc d'inhibiteurs réversibles ($k_2' = 0$): il n'y a pas de coupure de la liaison P-N dans nos conditions [20].

L'absence de phosphorylation de l'enzyme fait de ces phosphoramides des inhibiteurs assez faibles, devant être présents à des concentrations relativement élevées pour provoquer une inhibition notable. Dans ces conditions la toxicité de ces produits semble liée à leur action sur le matériel génétique [16] plutôt qu'à leur activité sur la cholinestérase.

Nous avons traité les données par des méthodes numériques (moindres carrés non linéaires). Il est également possible d'utiliser une méthode graphique [tracé de p en fonction de $-\ln(1 - p/s_0)$]; nous n'avons pas obtenu de bons résultats avec cette méthode car la transformation logarith-

mique entraîne une forte dispersion des points correspondant aux faibles valeurs de p , phénomène déjà signalé par ailleurs [17]. Il semble donc que les méthodes numériques soient préférables aux méthodes graphiques, conformément à ce qui a été observé avec les mesures de vitesses initiales [18].

Les mécanismes d'inhibition et les valeurs des constantes cinétiques rapportés dans ce travail ont pu être confirmés par une méthode spectrophotométrique qui fera l'objet d'une autre publication.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.R. Main, *Pharmacol. Ther.*, 6 (1979) 579.
- 2 J. Konickova et I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.*, 25 (1971) 2360.
- 3 A.E. Beezer et C.D. Stubbs, *Talanta*, 20 (1973) 27.
- 4 B. Tan et J.K. Grime, *J. Therm. Anal.*, 21 (1981) 367.
- 5 J.K. Grime, *Anal. Chim. Acta*, 118 (1980) 191.
- 6 E. Calvet et H. Prat, *Microcalorimétrie. Applications Physicochimiques et Biologiques*, Masson, Paris, 1956.
- 7 M.R. Eftink, R.E. Johnson et R.L. Biltonen, *Anal. Biochem.*, 111 (1981) 305.
- 8 H. Eriksson et K.B. Augustinsson, *Biochim. Biophys. Acta*, 567 (1979) 161.
- 9 I.H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York, 1975.
- 10 S.P. Datta, A.K. Grzybowski et B.A. Weston, *J. Chem. Soc.*, (1963) 792.
- 11 T. Yvernault, G. Yvernault et J.C. Bollinger, *C.R. Acad. Sci. Ser. C*, 287 (1978) 519.
- 12 D.W. Marquardt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 11 (1963) 431.
- 13 M. Tribout, S. Paredes et J. Leonis, *Biochem. J.*, 153 (1976) 89.
- 14 J.K. Grime, B. Tan et J. Jordan, *Anal. Chim. Acta*, 109 (1979) 393.
- 15 Ya.L. Kostyukovskii, Yu. A. Bruk, L.V. Pavlova, N.M. Slavachevskaya, A.V. Kokushkina, B.S. Mirkin et I.A. Belen'kaya, *Zh. Obshch. Khim.*, 42 (1972) 662.
- 16 J. Ashby, J.A. Styles et D. Paton, *Br. J. Cancer*, 38 (1978) 418.
- 17 G.L. Atkins et I.A. Nimmo, *Biochem. J.*, 135 (1973) 779.
- 18 J.W. Frazer et H.R. Brand, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 1730.
- 19 J.Y. Gal et T. Yvernault, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1971) 2770.
- 20 D.F. Heath et P. Casapieri, *Trans. Faraday Soc.*, 47 (1951) 1093.