

BBA 69283

EFFET ACCELERATEUR DE SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES HETEROCYCLIQUES SUR L'HYDROLYSE D'ESTERS NEUTRES PAR L'ACETYLCHOLINESTERASE ET LA BUTYRYLCHOLINESTERASE

BERNARD DESIRE et SIMONE SAINT-ANDRE

*Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Chimie et Pharmacologie,
 108, boulevard Pinel, 69272 Lyon Cedex 1 (France)*

(Received February 17th, 1981)

Key words: Acetylcholinesterase; Butyrylcholinesterase; Acceleration mechanism;
 Quaternary ammonium salt; Ester hydrolysis

Accelerating effect of heterocyclic quaternary ammonium salts on neutral ester hydrolysis by acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase

Summary

Some heterocyclic cations (1-methylacridinium, 1-methyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium and 1-methyl-3-methoxy-pyridinium) cause acceleration of hydrolysis of alkyl acetates (methyl, ethyl or *n*-propyl acetate) by acetylcholinesterase (acetylcholine acetylhydrolase EC 3.1.1.7) (Barnett, P. and Rosenberry, T.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7200–7206).

In this study, it is shown that (a) other mono- and bisquaternary ligands of pyridinium, quinolinium and benzoquinolinium series accelerate methyl-, ethyl- and *n*-propyl-acetate hydrolysis by acetylcholinesterase, (b) these ligands generally accelerate methyl-, ethyl- and *n*-propyl-acetate, -propionate and -butyrate, 2-methoxyethyl- and furfuryl-acetate, and ethylene-glycol diacetate hydrolysis by butyrylcholinesterase (acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8).

At the present time, the ability to accelerate enzymatic hydrolysis of neutral substrates appears to be restricted to some heterocyclic quaternary ammonium compounds. Acceleration which occurs at physiological ionic strength ($\Gamma/2 =$

Abbréviations: 2 (ou 4)-PAM, méthyl-1-hydroxyiminométhyl-2 (ou 4)-pyridinium; TMB-4, triméthylène-bis(hydroxyiminométhyl-4-pyridinium).

Supplementary data to this article are deposited with, and can be obtained from, Elsevier/North-Holland Biomedical press, B.V., BBA Data Deposition, P.O. Box 1345, 1000 BM Amsterdam, The Netherlands. References should be made to No. BBA/DD/177/69283/659, 267–282. The supplementary information includes: values of v_L/v_0 determined in the presence of appropriate concentrations of ligands 1–13 (Tables IV–VII).

0.155) involves ternary enzyme-substrate-ligand complex formation and interaction of ligands with the catalytic anionic subsite. It concerns the step leading to the enzyme-substrate complex formation and/or the acylation step of enzymes. Kinetic behaviour analogy of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the presence of the same ligands suggests that an identical acceleration mechanism arises for both enzymes.

Résumé

Quelques cations hétérocycliques (méthyl-1-acridinium, méthyl-1-hydroxy-iminométhyl-2-pyridinium et méthyl-1-méthoxy-3-pyridinium) produisent une accélération de l'hydrolyse des acétates d'alcoyle (acétates de méthyle, d'éthyle ou de *n*-propyle) par l'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) (Barnett, P. et Rosenberry, T.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7200—7206).

Dans la présente étude, il est montré que (a) d'autres ligands mono- et bis-quaternaires de la série des sels de pyridinium, de quinolinium et de benzoquinolinium manifestent un pouvoir accélérant sur l'hydrolyse des acétates de méthyle, d'éthyne et de *n*-propyle par l'acétylcholinestérase, (b) ces mêmes ligands accélèrent généralement l'hydrolyse par la butyrylcholinestérase (EC 3.1.1.8) des acétates, propionates et butyrates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle, des acétates de méthoxy-2-éthylene et de furfuryle et du diacétate d'éthylène-glycol. Actuellement, la capacité d'accélérer l'hydrolyse enzymatique de substrats neutres paraît limitée à certains composés ammoniums quaternaires hétérocycliques. L'accélération qui se produit à force ionique physiologique ($\Gamma/2 = 0.155$) implique la formation d'un complexe ternaire enzyme-substrat-ligand et l'interaction des ligands avec le sous-site anionique du centre actif. Elle concerne l'étape conduisant à la formation du complexe enzyme-substrat et/ou l'étape d'acylation des enzymes. L'analogie de comportement cinétique de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinesterase vis-à-vis des mêmes ligands conduit à penser qu'un mécanisme d'accélération identique intervient pour les deux enzymes.

Introduction

L'hydrolyse des acétates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle par l'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) est accélérée en présence des cations aromatiques *N*-méthylacridinium, 2-PAM et méthyl-1-méthoxy-3-pyridinium [1].

Le mécanisme de l'accélération invoqué par Barnett et Rosenberry [1] repose sur les propositions suivantes (a) l'étape limitante de l'hydrolyse enzymatique des acétates neutres serait constituée par l'ajustement induit d'un complexe intermédiaire acétylcholinestérase-substrat qui suivrait la formation du complexe enzyme-substrat initial et précéderait l'étape générale de catalyse acido-basique, (b) l'accélération concerne les étapes conduisant à l'acétylation de l'enzyme, (c) les ligands cationiques précités se lieraient au sous-site anionique du centre actif de l'acétylcholinestérase. L'interaction enzyme-ligand favoriserait alors l'ajustement induit des complexes acetylcholinestérase-substrats neutres.

Puisqu'en présence de *N*-méthylacridinium ou de 2-PAM, les vitesses d'hydrolyse des acétates neutres précédents représentent une fraction appréciable de la vitesse maximum d'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine, les mêmes auteurs [1] ont également suggéré que cette accélération pourrait être en rapport avec le mécanisme de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase.

Cependant, parmi les différents cations organiques testés, seulement le *N*-méthylacridinium, le 2-PAM et le méthyl-1-méthoxy-3-pyridinium se révélaient capables d'accélérer de façon significative l'hydrolyse par l'acétylcholinestérase des acétates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle [1]. La rareté du phénomène pouvait donc apparaître comme une restriction éventuelle à son extension au mécanisme de catalyse enzymatique de l'acétylcholine. Le but de ce travail était donc de rechercher d'une part, s'il existait d'autres cations organiques accélérateurs de l'hydrolyse de divers acétates neutres par l'acétylcholinestérase et de déterminer, d'autre part, l'effet des mêmes cations sur la cinétique de systèmes butyrylcholinestérase(EC 3.1.1.8) substrates neutres.

Nous avons observé que seuls des sels d'ammoniums hétérocycliques, mono ou bisquaternaires et mono- ou polynucléaires étaient accélérateurs de l'hydrolyse enzymatique de certains substrats neutres. Par ailleurs, le mécanisme de cette accélération ne pouvait être clairement défini.

Matériels et Méthodes

1. Matériels

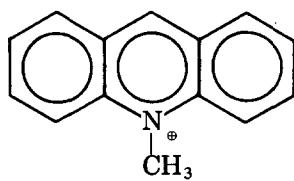
L'acétylcholinestérase était une préparation partiellement purifiée par chromatographie d'affinité extraite de l'organe électrique de *Torpedo marmorata*. Elle contenait un mélange de formes 18, 14 et 9 S et titrait approx. 1900 I.U./mg de protéines. La solution stock d'enzyme était conservée dans un tampon 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 0.01% azide de sodium (pH 7.2) à 4°C.

La butyrylcholinestérase de sérum de cheval était un produit Sigma (cholinestérase type IV-S).

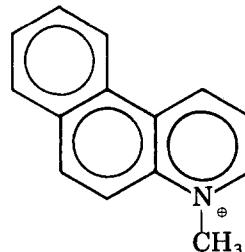
Certains effecteurs étudiés sont rassemblés dans le Tableau I (voir le Schéma I pour les formules structurales des cations *N*-méthylbenzoquinolinium). Les composés No. 5 à 13 du Tableau I ont été synthétisés au laboratoire selon les méthodes décrites par Chen et al. [2]; leur pureté était contrôlée par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et par analyse quantitative. Les substrats et les autres ligands utilisés étaient d'origine commerciale.

2. Technique et conditions de mesure

Les activités enzymatiques étaient déterminées avec un pH stat (système modulaire pour titrages automatiques Mettler). Le milieu réactionnel, d'un volume de 50 ml, était maintenu sous atmosphère d'azote. Toutes les vitesses étaient mesurées à 25 ± 0.1°C dans 0.155 M NaCl à pH 7.40. La titration des protons libérés par l'hydrolyse des substrats était réalisée avec 5 mM NaOH. Par suite de la solubilité insuffisante de certains esters, les mesures avec les butyrates d'éthyle et de propyle étaient effectuées en présence de 2% d'éthanol (v/v) et celles avec le propionate de butyle en présence de 2% d'isopropanol (v/v).



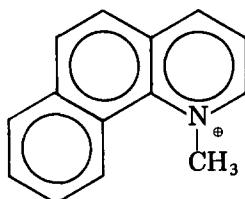
N-Méthylacridinium
(*N*-méthylbenzo-2,3-quinolinium)



N-Méthylbenzo-5,6-quinolinium



N-Méthylphénanthridinium
(*N*-méthylbenzo-3,4-quinolinium)



N-Méthylbenzo-7,8-quinolinium

Schéma I. Structure chimique des cations *N*-methylbenzoquinolinium.

3. Expression des résultats

Cinétique des systèmes enzymes-substrats cationiques-ligands. Les résultats sont exprimés par la valeur de K_L déterminée par la méthode de Wilkinson [3], les substrats utilisés étant l'acétyl- β -méthylcholine avec l'acétylcholinestérase et l'acétylcholine avec la butyrylcholinestérase.

Cinétique des systèmes enzymes-substrats neutres-ligands. Il est généralement admis que le mécanisme cinétique minimum qui explique l'hydrolyse d'un substrat (S) par l'acétylcholinestérase ou la butyrylcholinestérase (E) est celui du Schéma II (dans lequel sont seulement mentionnées les espèces enzymatiques en présence).

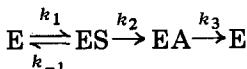


Schéma II

Trois étapes principales sont à considérer (1) la formation du complexe enzyme-substrat initial, ES, (2) l'étape d'acylation correspondant à la transformation de ES en enzyme acétylée EA, et caractérisée par une constante de vitesse k_2 , (3) l'étape de désacylation de EA caractérisée par une constante de vitesse k_3 .

En présence d'un effecteur réversible L, les autres espèces enzymatiques susceptibles d'être formées sont le complexe enzyme-ligand EL, le complexe ternaire enzyme-substrat-ligand ESL et le complexe enzyme acétylée-ligand EAL. Un ligand qui accélère l'hydrolyse en agissant sur l'une et/ou l'autre des deux

étapes qui précèdent la désacylation implique la formation d'un complexe ternaire ESL. Dans ce cas, il est apparent que l'accélération est caractérisée par une diminution de la pente des tracés de Lineweaver-Burk.

Certains résultats ont été analysés selon la méthode proposée par Barnett et Rosenberry [1]. Celle-ci considère le rapport r de la pente du tracé de Lineweaver-Burk à concentration fixe de ligand L à la pente observée en absence de L. Le graphe de $(r - 1)^{-1}$ en fonction de $[L]^{-1}$ est une droite de pente s et d'ordonnée à l'origine i . Soit $K_L = [E][L]/[EL]$, $K_S = [E][S]/[ES]$, $K_{LS} = [EL][S]/[ESL]$, $K_{SL} = [ES][L]/[ESL]$ et 'a' le rapport de la constante de vitesse d'acylation de ESL à la constante de vitesse d'acylation de ES; le facteur d'accélération $\alpha \equiv a$ $K_L/K_{SL} \equiv a K_S/K_{LS}$ qui est l'accélération relative maximum observée à concentration saturante de ligand est donné par l'équation 1.

$$\alpha = i/(i + 1) \quad (1)$$

La constante de dissociation K_L est obtenue à partir de l'équation 2.

$$K_L = s/(i + 1) \quad (2)$$

Si $\alpha > 1$, deux éventualités sont possibles: (1) la vitesse d'acylation de ESL est supérieure à celle de ES ($a > 1$) (2) le complexe EL a une affinité plus élevée pour le substrat que l'enzyme libre E ($K_S/K_{LS} > 1$). Ces deux mécanismes ne sont pas discernables et la probabilité pour qu'ils interviennent tous les deux à la fois ne peut, en toute rigueur, être considérée comme négligeable. Les ligands caractérisés par une valeur de α supérieure à 1 correspondent à $0 < r < 1$ et par suite à $(r - 1)^{-1} < -1$. Dans ces conditions, on a $i < -1$ et $s < 0$.

D'après les équations 1 et 2, le facteur d'accélération α et la constante de dissociation K_L sont inversement proportionnels à $i + 1$; en outre, la valeur de i est d'autant plus proche de -1 que l'accélération observée est plus grande. Il en résulte qu'une erreur absolue même faible sur i peut conduire à une erreur relative importante sur $i + 1$ et par suite à des valeurs sensiblement erronées de α et de K_L .

Le procédé ci-dessus souffre donc d'un certain manque de fiabilité. Il nécessite par ailleurs une consommation importante d'enzyme car les esters neutres utilisés sont généralement de mauvais substrats (c'est-à-dire que leur hydrolyse enzymatique est lente, relativement à celle de l'acétylcholine). Aussi, la plupart des résultats ont été exprimés par la valeur du rapport v_L/v_0 où v_0 et v_L sont les vitesses d'hydrolyse enzymatique à la même concentration de substrat, respectivement en absence et en présence d'une concentration appropriée de ligand. Les conditions expérimentales requièrent cette approche simple qui n'autorise pas une analyse détaillée du processus cinétique. Elle permet cependant de trier les ligands accélérateurs et de montrer que l'accélération observée concerne l'une et/ou l'autre des deux étapes qui précèdent la désacylation des enzymes (voir Résultats). Les valeurs rapportées de v_L/v_0 sont la moyenne d'au moins trois déterminations.

Résultats

1. Cinétique des systèmes acétylcholinestérase-acétyl-β-méthylcholine-ligands

Tous les effecteurs étudiés (Tableau I) se comportent comme des inhibiteurs

TABLEAU I

VALEURS DE $K_L \pm D.S.$ (M) RELATIVES A DIVERS SELS D'AMMONIUMS QUATERNAIERS INHIBITEURS REVERSIBLES DE L'HYDROLYSE DE SUBSTRATS CATIONIQUES PAR L'ACÉTYLCHOLINESTERASE ET LA BUTYRYLCHOLINESTERASE

Le composé No. 1 est un chlorure, les composés No. 2 à 9 sont des iodures et les composés No. 10 à 13 des diiodures. Les valeurs que nous avons déterminées sont relatives aux systèmes acétylcholinestérase de *T. marmorata*-acétyl- β -méthylcholine et butyrylcholinestérase de sérum de cheval-acétylcholine. Les valeurs de K_L des cations *N*-méthylbenzoquinolinium observées par d'autres auteurs avec l'acétylcholinestérase, d'*E. electricus* et la butyrylcholinestérase de sérum de cheval sont repérées par une lettre. Ces déterminations étaient faites à 25°C, en présence d'acétylcholine, sauf dans le cas (e) où la butyrylthiocholine fut utilisée. Par ailleurs, les conditions de mesure étaient les suivantes: (a) 0.1 M NaCl, 0.02 M MgCl₂, pH 7.0 [5]; (b) 0.1 M NaCl, pH 8.0 [1]; (c) 0.1 M NaCl, 0.02 M MgCl₂, pH 7.5 [2]; (d) absence de sels ajoutés, pH 7.5 [7]; (e) milieu 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4 [8].

No	Ligands	K_L Acétylcholinestérase	K_L Butyrylcholinestérase
1	2-PAM	(1.3 ± 0.2) 10 ⁻⁴	(6.6 ± 1.4) 10 ⁻⁴
2	4-PAM	(2.0 ± 0.3) 10 ⁻⁴	(5.1 ± 1.0) 10 ⁻⁴
3	<i>N</i> -Ethylquinolinium	(4.1 ± 0.9) 10 ⁻⁶	(2.4 ± 0.8) 10 ⁻⁵
4	<i>N</i> -Ethylquinaldinium	(1.4 ± 0.1) 10 ⁻⁵	(8.1 ± 1.3) 10 ⁻⁶
5	<i>N</i> -Méthylacridinium	(7.0 ± 2.2) 10 ⁻⁸	(4.2 ± 1.1) 10 ⁻⁸
		(2.19 ± 0.28) 10 ⁻⁷ (a)	5.3 · 10 ⁻⁸ (d)
		(1.75 ± 0.20) 10 ⁻⁷ (b)	(3.4 ± 0.7) 10 ⁻⁸ (e)
		(5.0 ± 0.2) 10 ⁻⁷ (c)	(2.4 ± 0.3) 10 ⁻⁷ (c)
6	<i>N</i> -n-Butylacridinium	(1.1 ± 0.2) 10 ⁻⁷	(5.6 ± 1.2) 10 ⁻⁸
7	<i>N</i> -Méthylphénanthridinium	(8.2 ± 2.1) 10 ⁻⁷	(7.0 ± 2.4) 10 ⁻⁸
8	<i>N</i> -Méthylbenzo-5,6-quinolinium	(5.6 ± 0.4) 10 ⁻⁶ (c)	(1.10 ± 0.02) 10 ⁻⁶ (c)
9	<i>N</i> -Méthylbenzo-7,8-quinolinium	(1.1 ± 0.3) 10 ⁻⁶	(2.6 ± 0.5) 10 ⁻⁷
		(8.9 ± 0.5) 10 ⁻⁶ (c)	(5.4 ± 0.2) 10 ⁻⁶ (c)
		(3.7 ± 0.7) 10 ⁻⁶	(8.8 ± 2.1) 10 ⁻⁷
		(1.8 ± 0.4) 10 ⁻⁵ (c)	(3.2 ± 0.1) 10 ⁻⁵ (c)
10	Décaméthylène-bisquinolinium	(2.1 ± 0.7) 10 ⁻⁹	(2.0 ± 0.6) 10 ⁻⁷
11	Décaméthylène-bisacridinium	(1.0 ± 0.4) 10 ⁻¹⁰	(1.0 ± 0.2) 10 ⁻⁹
12	Décaméthylène-bisphénanthridinium	(9.0 ± 1.9) 10 ⁻¹¹	(3.9 ± 1.0) 10 ⁻¹⁰
13	Décaméthylène-bis(benzo-5,6-quinolinium)	(1.1 ± 0.3) 10 ⁻⁹	(6.7 ± 1.6) 10 ⁻⁹

réversibles mixtes de l'acétylcholinestérase, c'est-à-dire qu'ils augmentent à la fois K_{app}/k_{cat} et $1/k_{cat}$, K_{app} et k_{cat} étant respectivement la constante apparente de Michaelis et la constante catalytique.

Les valeurs des constantes d'inhibition compétitives K_L montrent que les cations *N*-méthylbenzoquinolinium (composés Nos. 5 et 7 à 9, Tableau I) et surtout décäméthylène-bisbenzoquinolinium (composés No. 11 à 13, Tableau I) sont de puissants inhibiteurs réversibles de l'acétylcholinestérase. Leur affinité pour cette enzyme croît dans l'ordre: *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium < *N*-méthylbenzo-5,6-quinolinium < *N*-méthylphénanthridinium << *N*-methylacridinium << décäméthylène-bis(benzo-5,6-quinolinium) < décäméthylène-bisacridinium < décäméthylène-bisphénanthridinium.

Dans le cas des cations *N*-méthylbenzoquinolinium, l'affinité est nettement plus élevée lorsque l'hétérocycle polycyclique est symétrique par rapport à l'axe N⁺-CH₃ puisque la valeur de K_L du *N*-methylacridinium est inférieure d'au moins un ordre à celle des autres composés *N*-méthylbenzoquinolinium. Par contre, pour les cations décäméthylène-bisbenzoquinolinium, la symétrie des têtes cationiques aromatiques par rapport au même axe n'a pas d'influence sur

l'affinité car les valeurs de K_L du décaméthylène-bisacridinium et du décaméthylène-bisphénanthridinium ne sont pas significativement différentes. Cependant, dans cette dernière série de composés, lorsque l'un des cycles benzéniques n'est pas accolé au noyau pyridinium, comme dans le cas du décaméthylène-bis(benzo-5,6-quinolinium), l'affinité diminue d'environ un ordre. Le remplacement d'un groupe méthyle par un groupe *n*-butyle a relativement peu d'effet sur la liaison des cations *N*-alkylacridinium (composés No. 5 et 6, Tableau I).

Les valeurs de K_L des cations décaméthylène-bisquinolinium et bisbenzoquinolinium (composés No. 10 à 13, Tableau I) sont inférieures d'environ 3 à 4 ordres à celles des composés *N*-éthylquinolinium et *N*-méthylbenzoquinolinium correspondants (composés No. 3, 5, 7, et 8, Tableau I). Il est donc probable que les groupements cationiques de ces composés se lient à la fois au sous-site anionique du centre actif et à un site anionique périphérique comme cela est admis pour d'autres cations décaméthylène-bisonium [4-6].

Les valeurs de K_L des composés *N*-méthylbenzoquinolinium que nous avons déterminées dans le système acétylcholinestérase de *T. marmorata*-acétyl- β -méthylcholine sont comparées dans le Tableau I à celles observées par d'autres auteurs dans le système acétylcholinestérase d'*Electrophorus electricus*-acétylcholine. L'affinité de ces cations, déterminée dans des conditions diverses, est environ 2 à 8 fois plus élevée pour l'enzyme de *T. marmorata* que pour l'enzyme d'*E. electricus*. Cette différence n'est pas en rapport avec la nature des substrats cationiques utilisés puisqu'avec l'acétylcholinestérase de *T. marmorata*, nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs de K_L déterminées avec l'acétylcholine ou l'acétyl- β -méthylcholine.

2. Cinétique des systèmes butyrylcholinestérase-acétylcholine-ligands

Les différents ligands du Tableau I sont également des inhibiteurs réversibles mixtes de la butyrylcholinestérase.

L'affinité des cations *N*-méthylbenzoquinolinium et décaméthylène-bisbenzoquinolinium pour la butyrylcholinestérase et l'acétylcholinestérase croît selon la même séquence. Les cations *N*-méthylbenzoquinolinium ont une affinité plus élevée pour la butyrylcholinestérase que pour l'acétylcholinestérase, alors qu'on observe l'inverse dans le cas des cations décaméthylène-bisbenzoquinolinium.

Les ligands décaméthylène-bisquinolinium et bisbenzoquinolinium (composés No. 10 à 13, Tableau I) ont cependant une affinité pour la butyrylcholinestérase nettement supérieure (environ deux ordres) à celles des cations *N*-éthylquinolinium et *N*-méthylbenzoquinolinium correspondants (composés No. 3, 5, 7 et 8, Tableau I). Ce fait suggère la possibilité d'un double ancrage de ces composés sur la butyrylcholinestérase, à la fois sur le sous-site anionique du centre actif et sur un site anionique périphérique.

Les valeurs de K_L relatives aux cations *N*-méthylbenzoquinolinium sont comparées à celles de la littérature dans le Tableau I. La valeur observée pour le *N*-méthylacridinium est en accord avec celles des références [7,8]. Toutefois, les valeurs rapportées par Chen et al. [2] pour les différents cations *N*-méthylbenzoquinolinium sont d'environ un ordre plus élevées que celles que nous avons déterminées.

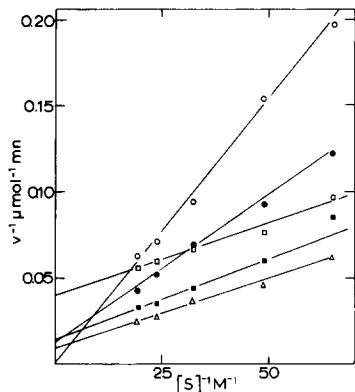


Fig. 1. Tracés de Lineweaver-Burk relatifs au système acétylcholinestérase-acétate d'éthyle. ○, absence de ligand; ●, *N*-méthylbenzo-3,4-quinolinium, 0,5 μM ; △, *N*-méthylbenzo-5,6-quinolinium, 5 μM ; ■, *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium, 2 μM ; □, décaméthylène-bisacridinium, 1 nM.

3. Cinétique des systèmes acétylcholinestérase-acétates d'alcoyle-ligands

Quelques tracés de Lineweaver-Burk obtenus avec l'acétate d'éthyle comme substrat sont montrés sur la Fig. 1, en absence et en présence de différents cations. Les graphes sont des droites dont l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro en absence de ligand, donc la constante apparente de Michaelis (K_{app})₀ est telle que $[S] \ll (K_{app})_0$. En présence de certains cations, les vitesses d'hydrolyse enzymatique des acétates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle sont nettement augmentées (Tableau II). De plus, les pentes des tracés de Lineweaver-Burk diminuent lorsque la concentration des ligands accélérateurs augmente, ce qui implique que l'accélération concerne l'étape de formation du complexe enzyme-substrat et/ou l'étape d'acylation de l'acétylcholinestérase. Par ailleurs, l'ordonnée à l'origine des graphes de v^{-1} en fonction de $[S]^{-1}$ est significativement positive en présence de concentrations suffisantes des mêmes cations (Fig. 1) c'est-à-dire que la vitesse maximum V_L des systèmes acétylcholinestérase-acétates d'alcoyle-ligands est nettement inférieure à la vitesse maximum V_0 des systèmes acétylcholinestérase-acétates d'alcoyle correspondants. Donc, les ligands inhibent fortement la désacétylation de l'enzyme. Cependant, la constante apparente de Michaelis en présence de ces composés (K_{app})_L devient du même ordre que les concentrations de substrats utilisées dans les mesures.

Il résulte des considérations précédentes que le rapport r de la pente (K_{app}/V)_L du tracé de Lineweaver-Burk en présence de ligand accélérateur à la pente (K_{app}/V)₀ en absence de ligand est tel que $v_L/v_0 \leq r^{-1}$. Donc lorsque les valeurs de v_L/v_0 sont supérieures à 1, on a nécessairement $r < 1$, c'est-à-dire que l'accélération correspond à l'une et/ou l'autre des deux étapes qui précèdent la désacétylation.

Les valeurs de v_L/v_0 des Tableaux II and IV (voir 'BBA data deposition pour le Tableau IV) relatives à l'acétylcholinestérase montrent que les différents cations aromatiques étudiés sont accélérateurs ou inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique des acétates d'alcoyle; cependant, dans certains cas, aucun effet manifeste dans un sens ou dans l'autre n'est observé, bien que les concentra-

TABLEAU II

VALEURS DE V_L/V_0 (\pm D.S.) RELATIVES AUX SYSTEMES ACETYLCHOLINESTERASE-ACETATES-D'ALCOYLE-LIGANDS ET BUTYRYLCHOLINESTERASE-ACETATES D'ALCOYLE-LIGANDS

Les concentrations d'acétates d'alcoyle sont pour l'acétylcholinestérase (A) et la butyrylcholinestérase (B) respectivement: (a) 50 at 100 mM avec l'acétate de méthyle; (b) 25.6 et 51.2 mM avec l'acétate d'éthyle; (c) 10.3 at 20.6 mM avec l'acétate de *n*-propyle. La concentration (M) de ligand à laquelle v_L a été mesurée est indiquée entre parenthèses après les valeurs de v_L/v_0 .

Ligand No.	Acétate de méthyle	Acétate d'éthyle	Acétate de <i>n</i> -propyle
1	A $1.68 \pm 0.09 (5 \cdot 10^{-4})$	$1.31 \pm 0.11 (10^{-3})$	$0.99 \pm 0.09 (10^{-3})$
	B $2.40 \pm 0.20 (10^{-3})$	$1.40 \pm 0.10 (10^{-3})$	$0.50 \pm 0.08 (10^{-3})$
2	A $0.75 \pm 0.08 (4 \cdot 10^{-3})$	$1.77 \pm 0.14 (4 \cdot 10^{-3})$	$0.58 \pm 0.04 (4 \cdot 10^{-3})$
	B $1.35 \pm 0.11 (10^{-3})$	$1.14 \pm 0.07 (4 \cdot 10^{-3})$	$0.65 \pm 0.06 (10^{-3})$
3	A $2.98 \pm 0.11 (5 \cdot 10^{-5})$	$4.53 \pm 0.37 (2 \cdot 10^{-5})$	$3.62 \pm 0.18 (5 \cdot 10^{-5})$
	B $1.34 \pm 0.12 (10^{-4})$	$2.48 \pm 0.20 (10^{-4})$	$0.55 \pm 0.05 (10^{-4})$
4	A $1.63 \pm 0.09 (10^{-4})$	$3.79 \pm 0.31 (10^{-4})$	$3.09 \pm 0.25 (10^{-4})$
	B $1.06 \pm 0.04 (5 \cdot 10^{-4})$	$5.27 \pm 0.20 (10^{-4})$	$0.51 \pm 0.04 (10^{-4})$
5	A $2.01 \pm 0.14 (2 \cdot 10^{-7})$	$2.20 \pm 0.21 (10^{-7})$	$1.75 \pm 0.08 (2 \cdot 10^{-7})$
	B $1.67 \pm 0.13 (2 \cdot 10^{-7})$	$3.72 \pm 0.35 (2 \cdot 10^{-7})$	$1.08 \pm 0.03 (10^{-6})$
6	A $4.17 \pm 0.32 (2 \cdot 10^{-7})$	$3.25 \pm 0.33 (10^{-7})$	$1.99 \pm 0.14 (2 \cdot 10^{-7})$
	B $1.77 \pm 0.10 (10^{-7})$	$5.88 \pm 0.15 (10^{-7})$	$1.74 \pm 0.10 (10^{-7})$
7	A $2.03 \pm 0.12 (10^{-6})$	$1.98 \pm 0.13 (10^{-6})$	$1.44 \pm 0.08 (10^{-6})$
	B $3.66 \pm 0.31 (10^{-7})$	$6.28 \pm 0.30 (10^{-7})$	$1.32 \pm 0.20 (10^{-7})$
8	A $1.47 \pm 0.13 (10^{-5})$	$3.39 \pm 0.26 (10^{-5})$	$2.14 \pm 0.16 (10^{-5})$
	B $0.80 \pm 0.06 (5 \cdot 10^{-6})$	$1.43 \pm 0.13 (5 \cdot 10^{-6})$	$0.42 \pm 0.02 (5 \cdot 10^{-6})$
9	A $3.18 \pm 0.19 (2.5 \cdot 10^{-5})$	$6.50 \pm 0.39 (2.5 \cdot 10^{-5})$	$3.61 \pm 0.22 (2.5 \cdot 10^{-5})$
	B $2.96 \pm 0.23 (5 \cdot 10^{-6})$	$7.28 \pm 0.31 (5 \cdot 10^{-6})$	$1.93 \pm 0.18 (5 \cdot 10^{-6})$
10	A $1.07 \pm 0.10 (2 \cdot 10^{-8})$	$0.97 \pm 0.08 (2 \cdot 10^{-8})$	$0.96 \pm 0.08 (2 \cdot 10^{-8})$
	B $1.43 \pm 0.13 (10^{-6})$	$1.33 \pm 0.18 (10^{-6})$	$1.08 \pm 0.10 (2 \cdot 10^{-6})$
11	A $1.54 \pm 0.12 (2.5 \cdot 10^{-9})$	$3.82 \pm 0.27 (2.5 \cdot 10^{-9})$	$0.82 \pm 0.03 (2.5 \cdot 10^{-9})$
	B $0.78 \pm 0.05 (10^{-8})$	$1.29 \pm 0.05 (2.5 \cdot 10^{-8})$	$1.50 \pm 0.11 (2 \cdot 10^{-8})$
12	A $0.99 \pm 0.05 (2 \cdot 10^{-8})$	$1.10 \pm 0.11 (2 \cdot 10^{-8})$	$0.85 \pm 0.06 (1 \cdot 10^{-8})$
	B $1.39 \pm 0.13 (2 \cdot 10^{-8})$	$2.06 \pm 0.18 (10^{-7})$	$1.56 \pm 0.12 (2 \cdot 10^{-8})$
13	A $0.84 \pm 0.07 (2 \cdot 10^{-7})$	$0.80 \pm 0.08 (2 \cdot 10^{-7})$	$0.87 \pm 0.07 (2 \cdot 10^{-7})$
	B $0.83 \pm 0.02 (2 \cdot 10^{-7})$	$1.21 \pm 0.10 (2 \cdot 10^{-7})$	$1.35 \pm 0.15 (2 \cdot 10^{-7})$

tions de ligands utilisées soient nettement supérieures aux valeurs de K_L déterminées avec l'acétyl- β -méthylcholine comme substrat (ex. composés No. 1 et 10 avec l'acétate de propyle). L'examen des Tableaux II et IV conduit aux observations générales suivantes; (a) tous les cations *N*-alkylquinolinium et *N*-alkylbenzoquinolinium (composés No. 3 à 9) accélèrent l'hydrolyse par l'acétylcholinestérase des acétates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle; (b) les diiodures de décäméthylène-bisquinolinium et bisbenzoquinolinium (composés No. 10 à 13) sont inhibiteurs ou sans effet sur l'hydrolyse des quatre acétates d'alcoyle à l'exception du décäméthylène-bisacridinium qui accélère l'hydrolyse enzymatique des acétates de méthyle et d'éthyle; (c) l'ensemble des cations inhibe l'hydrolyse de l'acétate de *n*-butyle, les composés No. 3, 4 et 12 n'ayant pas cependant un effet bien net; (d) les composés accélérateurs de l'hydrolyse enzymatique de l'un quelconque des acétates d'alcoyle accélèrent toujours la catalyse de l'acétate d'éthyle; (e) l'effet accélérateur des ligands du Tableau II en fonction du groupement alcoyle des acétates se manifeste avec la

TABLEAU III

FACTEURS D'ACCELERATION α ET VALEURS DE K_L RELATIFS A QUELQUES SYSTEMES ACETYLCHOLINESTERASE-ACETATE D'ETHYL LIGANDS ET BUTYRYLCHOLINESTERASE-ESTERS NEUTRES-LIGANDS

Ligands	Acéthylcholin-estérase acétate d'éthyle		Butyrylcholin-estérase acétate d'éthyle		Butyrylcholin-estérase propionate d'éthyle	
	α	K_L (M)	α	K_L (M)	α	K_L (M)
<i>N</i> -Ethylquinolinium	7.7	$8.7 \cdot 10^{-6}$	2.8	$1.4 \cdot 10^{-5}$		
<i>N</i> -Ethylquinaldinium	4.6	$1.1 \cdot 10^{-5}$				
<i>N</i> -Méthylacridinium	9.3	$2.4 \cdot 10^{-7}$	7.7	$4.8 \cdot 10^{-8}$	5.5	$1.3 \cdot 10^{-7}$
<i>N</i> -Butylacridinium	7.0	$9.8 \cdot 10^{-8}$				
<i>N</i> -Méthylphénanthridinium	4.9	$1.9 \cdot 10^{-6}$				
<i>N</i> -Méthylbenzo-5,6-quinolinium	5.5	$4.9 \cdot 10^{-6}$				
<i>N</i> -Méthylbenzo-7,8-quinolinium	8.2	$4.9 \cdot 10^{-6}$				

fréquence et l'intensité les plus élevées dans l'ordre éthyle > méthyle > *n*-propyle.

Quelques valeurs du facteur d'accélération α et de la constante de dissociation K_L déterminées à partir des graphes représentant les variations de $(r - 1)^{-1}$ en fonction de $[L]^{-1}$, comme indiqué dans Matériels et Méthodes, sont rapportées dans le Tableau III. Les valeurs de K_L du *N*-éthylquinaldinium, du *N*-butylacridinium et du *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium sont identiques à celles déterminées dans le système acéthylcholinestérase-acétyl- β -méthylcholine (Tableau I). Par contre, les valeurs de K_L du *N*-éthylquinolinium, du *N*-méthylacridinium, du *N*-méthylphénanthridinium et du *N*-méthylbenzo-5,6-quinolinium sont 2 à 4 fois supérieures à celles mesurées avec l'acétyl- β -méthylcholine comme substrat (Tableau I). Le facteur d'accélération α de l'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'éthyle par le *N*-méthylacridinium est environ 2 fois plus élevé pour l'acéthylcholinestérase de *T. marmorata* (Tableau III) que pour celle d'*E. electricus* [1].

Lorsque le pH augmente de 5,4 à 7,9, la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'éthyle augmente à la fois en absence de ligand et en présence de *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium 25 μ M. A cette concentration, la capacité accélératrice de ce cation, mesurée par le rapport v_L/v_0 , augmente légèrement avec le pH (Fig. 2).

Le *N*-méthylacridinium inhibe l'hydrolyse par l'acéthylcholinestérase d'autres acétates neutres non rapportés dans les Tableaux II et IV, tels que les acétates d'isopropyle, d'isobutyle, de *n*-amyle, de diéthylméthyle, de cyclopentyle, de benzyle et de méthoxy-2-éthyle. L'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'éthyle est inhibée par les ligands suivants (non mentionnés dans les tableaux): tacrine (amino-9-tétrahydro-1,2,3,4-acridine), acriflavine, tétraméthylammonium, gal-lamine, pentaméthonium, toxogonine, TMB-4 et *N*-(hydroxy-2-éthyl)-hydroxy-iminométhyl-4-pyridinium.

4. Cinétique des systèmes butyrylcholinestérase-esters neutres-ligands

Les considérations générales développées pour les systèmes acéthylcholine-

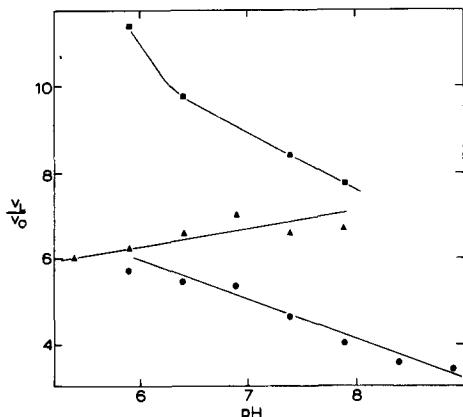


Fig. 2. Variations de v_L/v_0 en fonction du pH. ▲, acétylcholinestérase, acétate d'éthyle 25.6 mM, *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium, 25 μ M; ■, butyrylcholinestérase, acétate d'éthyle, 51.2 mM, *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium, 5 μ M; ●, butyrylcholinestérase, propionate d'éthyle, 15.4 mM, *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium, 5 μ M.

stérase-acétates d'alcoyle-ligands s'appliquent également ici. En particulier, les pentes des tracés de Lineweaver-Burk diminuent lorsque les concentrations de ligands accélérateurs augmentent, c'est-à-dire qu'ils agissent au niveau de l'une et/ou l'autre des deux étapes qui précèdent la désacylation. En outre, la vitesse maximum et la constante apparente de Michaelis des systèmes butyrylcholinestérase-esters neutres-ligands sont respectivement inférieures aux mêmes paramètres cinétiques des systèmes butyrylcholinestérase-esters neutres correspondants.

Les constatations suivantes sont déduits des valeurs de v_L/v_0 des Tableaux II et IV à VII (voir BBA Data Deposition pour les Tableaux IV à VII): (a) tous les ligands accélèrent l'hydrolyse de l'acétate d'éthyle par la butyrylcholinestérase (Tableau II); (b) comme dans le cas de l'acétylcholinestérase, aucun ligand n'accélère l'hydrolyse de l'acétate de *n*-butyle par la butyrylcholinestérase (Tableau IV); (c) le propionate et le butyrate d'éthyle sont accélérés par tous les cations quinolinium et benzoquinolinium (composés No. 3 à 13, Tableaux V et VI); (d) le décaraméthylène-bisphénanthridinium accélère l'hydrolyse de tous les esters, ceux de *n*-butyle exceptés; (e) l'effet accélérateur des ligands sur l'hydrolyse des esters d'alcoyle se produit avec la fréquence et l'intensité les plus élevées dans l'ordre des groupements éthyle > méthyle > *n*-propyle; (f) l'hydrolyse du propionate de *n*-butyle n'est généralement pas accélérée de façon manifeste (Tableau V); (g) l'hydrolyse du butyrate de *n*-propyle est toujours inhibée sauf par les deux composés dicationiques No. 10 et 12 (Tableau VI); (h) l'hydrolyse du diacétate d'éthylène-glycol et des acétates de méthoxy-2-éthyle et de furfuryle est le plus souvent activée par les cations *N*-méthylbenzoquinolinium, décaraméthylène-bisquinolinium et bisbenzoquinolinium (composés No. 5 à 13, Tableau VII); (i) certains ligands accélérateurs de l'acétylcholinestérase sont inhibiteurs de la butyrylcholinestérase (ex. acétate de *n*-propyle avec les composés No. 3, 4 et 8, Tableau II) ou vice versa (acétate de *n*-propyle et composés No. 11 à 13, Tableau II).

Quelques facteurs d'accélération α et les valeurs correspondantes de K_L sont

rapportés dans le Tableau III. Les valeurs de K_L du *N*-éthylquinolinium et du *N*-méthylacridinium sont semblables lorsque l'acétylcholine ou l'acétate d'éthyle sont utilisés comme substrat. Par contre, la valeur de K_L du *N*-méthylacridinium est environ 3 fois plus élevée avec le propionate d'éthyle (Tableau III) qu'avec l'acétylcholine (Tableau I).

Le pouvoir accélérateur du *N*-méthylbenzo-7,8-quinolinium 5 μM sur l'hydrolyse par la butyrylcholinestérase de l'acétate et du propionate d'éthyle diminue lorsque le pH augmente de 5,9 à 8,9, à l'inverse de ce qui est observé avec l'acétylcholinestérase (Fig. 2).

L'hydrolyse de l'acétate d'éthyle par la butyrylcholinestérase est inhibée en présence des ligands suivants (non mentionnés dans les tableaux): tétraméthylammonium, tétraéthylammonium, choline, *N*-méthylpyridinium, *N*-*n*-butylpyridinium, phényltriméthylammonium, tacrine, décaméthonium et TMB-4.

Discussion

Spécificité des hétérocycles cationiques pour l'accélération de l'hydrolyse enzymatique des esters neutres

Parmi les ligands testés, seuls des cations *N*-méthylpyridinium substitués, mono- et bisquinolinium et mono- et bisbenzoquinolinium accélèrent l'hydrolyse d'esters neutres par l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Les cations tétraalkylammonium, la choline, le décaméthonium, le *N*-méthylpyridinium qui accélèrent la méthanesulfonylation de l'acétylcholinestérase d'organe électrique d'*E. electricus* [9], d'érythrocytes de boeuf [10] ou de tête de mouche [10] inhibent l'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'éthyle.

Les différents ligands qui manifestent un pouvoir accélérateur sur l'hydrolyse enzymatique de substrats neutres sont tous caractérisés par leur configuration coplanaire et par la diminution de la concentration de la charge positive sur l'azote quaternaire due à une stabilisation par résonance interne (délocalisation) de l'hétérocyclic aminé mono ou polycyclique. Ces propriétés intrinsèques des cations hétérocycliques ne suffisent cependant pas à expliquer intégralement l'activation car les substituants jouent un rôle important. En effet, dans la série des sels de pyridinium, les 2 et 4-PAM accélèrent l'hydrolyse de l'acétate d'éthyle par l'acétylcholinestérase alors que le *N*-méthylpyridinium l'inhibe; le remplacement du groupe *N*-méthyle du 4-PAM par un groupe *N*-(hydroxy-2-éthyle) conduit aussi à une inhibition du même système enzyme-substrat. Dans la série des sels de quinolinium également, le *N*-méthylhydroxy-7-quinolinium et le *N*-méthylmethoxy-6-quinolinium, inhibent l'hydrolyse de l'acétate de méthyle par l'acétylcholinestérase [1] alors que le *N*-éthylquinolinium et le *N*-éthylquinaldinium l'accélèrent (Tableau II).

La capacité du 2-PAM d'accélérer l'hydrolyse d'acétates d'alcoyle par l'acétylcholinestérase ne semble pas nécessairement corrélée avec ses propriétés réactivatrices de l'enzyme phosphorylée comme cela a été suggéré [1]. En effet, des oximes à pouvoir réacteur généralement supérieur, comme la toxogonine et le TMB-4, inhibent l'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'éthyle.

Spécificité de certains esters neutres vis-à-vis de l'accélération de l'hydrolyse enzymatique par des cations hétérocycliques à caractère aromatique

L'accélération de l'hydrolyse d'acétates d'alcoyle par l'acétylcholinestérase

et la butyrylcholinestérase sous l'influence de cations hétérocycliques se manifeste seulement lorsque le 'groupe partant' des acétates neutres n'excède pas la longueur du groupement *n*-propyle. Ceci est à rapprocher, dans le cas de l'acétylcholinestérase, de relations structure-activité déduites de la cinétique d'hydrolyse enzymatique d'acétates neutres. Celles-ci sont consistantes avec un modèle de site catalytique dans lequel les groupes catalytiquement actifs sont situés au fond d'une crevasse dont les parois permettent l'adsorption de 'groupes partants' de longueur au plus égale à celle du groupe *n*-butyle [11]. L'encombrement du site par des groupes plus volumineux que le groupe *n*-propyle peut donc être une gêne au déclanchement des modifications enzymatiques qui conditionnent l'accélération. La limitation de longueur du 'groupe partant' est donc une condition nécessaire à l'accélération de l'hydrolyse enzymatique des acétates d'alcoyle. Il faut noter également que le *N*-méthylacridinium inhibe l'hydrolyse de l'acétate d'isopropyle par l'acétylcholinestérase.

Le même critère de longueur du 'groupe partant' est aussi nécessaire pour l'accélération de la cinétique des systèmes butyrylcholinestérase-propionate d'alcoyle puisqu'aucun ligand n'accélère de façon nette l'hydrolyse du propionate de *n*-butyle. Cependant, certains cations mono- et bisbenzoquinolinium accélèrent l'hydrolyse par la butyrylcholinestérase d'acétates à 'groupe partant' de longueur supérieure au groupe *n*-propyle lorsque le 'groupe partant' n'est pas un groupement alcoyle (acétates de méthoxy-2-éthyle et de furfuryl et diacétate d'éthylène-glycol, Tableau VII, BBA Data Bank Deposition); ceci suggère un mode de liaison différent de ces groupes sur la surface de l'enzyme. La spécificité de l'accélération en fonction du substrat est plus stricte avec l'acétylcholinestérase puisque le système acétylcholinestérase-acétate de méthoxy-2-éthyle est inhibé par le *N*-méthylacridinium.

L'encombrement du groupe acylant intervient sur la cinétique d'hydrolyse des esters d'alcoyle par la butyrylcholinestérase car l'effect accélérateur des ligands se manifeste moins souvent avec le butyrate qu'avec l'acétate et le propionate de *n*-propyle (Tableaux II, V et VI).

Site de liaison des ligands accélérateurs

En milieu de force ionique 'physiologique' ($0.1 \leq \Gamma/2 \leq 0.2$), certains cations accélèrent la cinétique réactionnelle de l'acétylcholinestérase avec les fluorures de méthanesulfonyle [9], de diméthylcarbamyle [12] et d'acétyle [13] et avec les acétates de méthyle, d'éthyle et de *n*-propyle [1]. Puisqu'en plus du sous-site anionique du centre actif, plusieurs sites anioniques périphériques sont décrits sur l'acétylcholinestérase [14], il est nécessaire de préciser le site de liaison des cations accélérateurs. Avec les divers agents acylants qui précèdent, l'accélération a été en général attribuée à la liaison du ligand accélérateur au sous-site anionique du centre actif de l'acétylcholinestérase. Cette assertion repose sur le critère de l'identité des valeurs de K_L déterminées dans les systèmes enzyme-acétylcholine-ligand et enzyme-agent acylant-ligand. La condition, quoique non suffisante, est nécessaire si les espèces enzymatiques impliquées dans le mécanisme cinétique sont en équilibre [1]. Nous avons vu, à la fois avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, que certaines valeurs de K_L des ligands accélérateurs sont indépendantes de la nature du substrat alors que d'autres sont assez différentes selon le substrat utilisé. Pour le *N*-méthylacridi-

nium, la différence observée a été attribuée par Barnett et Rosenberry [1], dans le cadre du mécanisme qu'ils suggèrent, à la possibilité que ce cation accélère la catalyse enzymatique de certains acétates d'alcoyle dans des conditions où les différentes formes enzymatiques intermédiaires impliquées dans un ajustement induit des complexes acétylcholinestérase-substrat ne sont pas totalement équilibrées. Cependant, il apparaît aussi que les différences observées peuvent résulter du procédé utilisé pour déterminer les valeurs de K_L des ligands lorsqu'ils agissent comme accélérateurs de l'hydrolyse des substrats neutres (voir Matériels et Méthodes). Ainsi, le critère d'identité des valeurs de K_L observées dans les systèmes enzymes-substrats cationiques-ligands et enzymes-esters neutres-ligands ne semble pas suffisamment fiable.

En fait, des observations plus directes en spectroscopie de fluorescence ont montré tant pour l'acétylcholinestérase [15] que pour la butyrylcholinestérase [7,8], la liaison exclusive du *N*-méthylacridinium au sous-site anionique du centre actif des enzymes. La spécificité de cette liaison a été confirmée dans le cas de l'acétylcholinestérase pour des concentrations de *N*-méthylacridinium inférieures à 10 μM lors d'études cinétiques de relaxation par saut thermique [16]. Ces observations conduisent à admettre que le site de liaison du *N*-méthylacridinium inhibiteur de la catalyse des substrats cationiques ou accélérateur de l'hydrolyse des esters neutres est le sous-site anionique du centre actif de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase. En outre, il est aussi généralement admis que les oximes comme le 2-PAM et le 4-PAM se lient au sous-site anionique du centre actif [17]. Par suite de l'analogie structurale des autres composés monocationiques accélérateurs avec le *N*-méthylacridinium, il semble donc raisonnable d'attribuer l'accélération de l'hydrolyse enzymatique des esters neutres à l'interaction des ligands avec le sous-site anionique du centre actif de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase.

La liaison des ligands décaraméthylène-bisquinolinium et bisbenzoquinolinium (composés No. 10 à 13) à la fois au sous-site anionique du centre actif et à un site anionique périphérique apparaît probable, au moins dans le cas de l'acétylcholinestérase, compte tenu de leur très grande affinité en comparaison avec celle des cations *N*-éthylquinolinium et *N*-méthylbenzoquinolinium correspondants. La participation du site anionique périphérique au mécanisme de l'accélération de l'hydrolyse des esters neutres ne peut cependant être mise en évidence puisque l'interaction avec le sous-site anionique du centre actif semble déjà suffisante pour activer l'enzyme.

L'affinité élevée des cations polynucléaires *N*-méthylbenzoquinolinium de structure coplanaire, rigide et hydrophobe suggère l'existence d'une zone de liaison hydrophobe de conformation appropriée à proximité du sous-site anionique du centre actif des enzymes. Cette zone pourrait, en première approximation, être considérée comme complémentaire du *N*-méthylacridinium qui présente la meilleure affinité parmi les ligands *N*-méthylbenzoquinolinium. Elle devrait cependant présenter une certaine plasticité lui permettant d'accommoder les différents cations *N*-méthylbenzoquinolinium dont la rigidité exclut toute déformation. On pourrait l'identifier avec la zone de liaison hydrophobe adjacente au sous-site anionique déjà décrite pour expliquer les relations observées entre la structure d'inhibiteurs organophosphorés et leur vitesse de phosphorylation des enzymes [18,19]. Dénommée aire hydrophobe A₂ par Kaba-

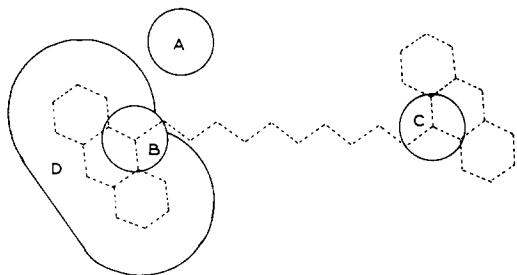


Fig. 3. Schéma présumé concernant la topographie relative de sites de liaison à la surface de l'acétylcholinestérase. A, site estérasique; B, sous-site anionique du centre actif; C, site anionique périphérique; D, zone hydrophobe A₂ de Kabachnik et al. [19]. La zone hydrophobe A₂ supposée complémentaire du noyau acridinium possèderait une plasticité qui lui permettrait certaines déformations afin d'accorder les autres noyaux benzoquinolinium. Le décaméthylène-bisacridinium (en pointillé) est représenté fixé à ses sites de liaison.

chnik et al. [19], elle serait susceptible d'accorder une chaîne linéaire à 8 C sur l'acétylcholinestérase et à 6 C sur la butyrylcholinestérase. Elle a, en outre, été proposée comme zone de liaison de la tacrine et de dérivés structuralement reliés sur l'acétylcholinestérase [20]. L'existence d'un pouvoir accélérateur de l'hydrolyse des esters neutres implique, par ailleurs, le non recouvrement du site estérasique par les ligands activateurs.

Les considérations précédentes suggèrent que sur la surface de l'acétylcholinestérase, la disposition relative des différents sites impliqués ci-dessus pourrait être celle représentée Fig. 3, compte tenu de la distance approx. de 5 Å entre sous-site anionique du centre actif et site estérasique [21] et de la distance de 14 Å entre sous-site anionique du centre actif et site anionique périphérique [4,5].

Conclusion

Il a été présumé que les ligands accélérateurs favorisent l'ajustement induit des complexes acétylcholinestérase-acétates d'alcoyle [1]. Un des critères d'interaction par ajustement induit est effectivement l'accélération de la réaction enzyme-substrat produite par la liaison de ligands sur des sites enzymatiques spécifiques [22].

En fait, le mode d'action des ligands accélérateurs ne peut être défini avec précision. S'il est bien établi que l'accélération implique la formation d'un complexe ternaire enzyme-substrat-ligand, l'étude cinétique ne permet pas de discerner si les ligands accélérateurs augmentent l'affinité des cholinestérases pour le substrat neutre et/ou s'ils augmentent la vitesse d'acylation proprement dite des enzymes.

Par ailleurs, des ligands accélérateurs ont été observés seulement dans la série des ammoniums quaternaires hétérocycliques. Cette spécificité apparente de structure peut sembler une restriction à l'établissement d'un rapport entre le mécanisme de l'accélération et celui de la catalyse enzymatique de l'acétylcholine.

Cependant, la similitude des processus catalytiques de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase et l'analogie structurale des ligands accélérateurs

pour les deux enzymes suggèrent que le mécanisme d'accélération par les hétérocycles cationiques pourrait être commun aux systèmes acétylcholinestérase-acétates d'alcoyle et butyrylcholinestérase-esters neutres.

Remerciements

Nous remercions Mr. G. Blanchet qui nous a fourni la préparation partiellement purifiée d'acétylcholinestérase de *T. marmorata* utilisée dans cette étude.

Bibliographie

- 1 Barnett, P. et Rosenberry, T.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7200—7206
- 2 Chen, W.-S., Cocolas, G.H., Cavallito, C.J. et Ja Chai, K. (1977) J. Med. Chem. 20, 1617—1622
- 3 Wilkinson, G.N. (1961) Biochem. J. 80, 324—332
- 4 Belleau, B., Di Tullio, V. et Tsai, Y.H. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 41—45
- 5 Mooser, G., Schulman, H. et Sigman, D.S. (1972) Biochemistry 11, 1595—1602
- 6 Bolger, M.B. et Taylor, P. (1979) Biochemistry 18, 3622—3629
- 7 Chan, L.M., Himel, C.M. et Main, A.R. (1974) Biochemistry 13, 86—90
- 8 Eriksson, H. et Augustinsson, K.-B. (1979) Biochim. Biophys. Acta 567, 161—173
- 9 Kitz, R.J. et Wilson, I.B. (1963) J. Biol. Chem. 238, 745—748
- 10 Krupka, R.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 370, 197—207
- 11 Järv, J., Kesvatera, T. et Aaviksaar, A. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 315—322
- 12 Metzger, H.P. et Wilson, I.B. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3432—3435
- 13 Metzger, H.P. et Wilson, I.B. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 263—269
- 14 Rosenberry, T.L. (1975) Adv. Enzymol. 43, 103—218
- 15 Mooser, G. et Sigman, D.S. (1974) Biochemistry 13, 2299—2307
- 16 Rosenberry, T.L. et Neumann, E. (1977) Biochemistry 16, 3870—3878
- 17 Wilson, I.B. et Froede, H.C. (1971) Drug design (Ariens, E.J., ed.), Vol. II, pp. 213—229, Academic Press, New-York
- 18 Bracha, P. et O'Brien, R.D. (1968) Biochemistry 7, 1545—1554
- 19 Kabachnik, M.I., Brestkin, A.P., Godovikov, N.N., Michelson, M.J., Rosengart, E.V. et Rosengart, V.I. (1970) Pharmacol. Rev. 22, 355—388
- 20 Steinberg, G.M., Mednick, M.L., Maddox, J., Rice, R. et Cramer, J. (1975) J. Med. Chem. 18, 1056—1061
- 21 Krupka, R.M. (1966) Biochemistry 5, 1988—1998
- 22 Koshland, D.E., Jr. et Neet, K.E. (1968) Annu. Rev. Biochem. 37, 359—410