

This article was downloaded by:
On: 30 January 2011
Access details: Access Details: Free Access
Publisher Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

INHIBITION REVERSIBLE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE PAR QUELQUES PHOSPHORAMIDES ALIPHATIQUES

Jean Debord^a; Michel Labadie^a; Jean-Claude Bollinger^b; Théophile Yvernault^b

^a Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Limoges Cédex, France ^b Laboratoire de Chimie Générale et Analytique, Faculté des Sciences, Limoges Cédex, France

To cite this Article Debord, Jean , Labadie, Michel , Bollinger, Jean-Claude and Yvernault, Théophile(1985) 'INHIBITION REVERSIBLE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE PAR QUELQUES PHOSPHORAMIDES ALIPHATIQUES', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 22: 1, 121 – 130

To link to this Article: DOI: 10.1080/03086648508073361

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03086648508073361>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

INHIBITION REVERSIBLE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE PAR QUELQUES PHOSPHORAMIDES ALIPHATIQUES

JEAN DEBORD* et MICHEL LABADIE

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, rue du
Docteur-Marcland, 87032 Limoges Cédex (France)*

JEAN-CLAUDE BOLLINGER* et THÉOPHILE YVERNAULT

*Laboratoire de Chimie Générale et Analytique, Faculté des Sciences,
123 avenue Albert-Thomas, 87060 Limoges Cédex (France)*

(Received June 28, 1984)

The inhibition of horse serum butyrylcholinesterase by 16 aliphatic phosphoramides OPXYZ (with X, Y, Z = Me; NMe₂; NHet; NEt₂; N; N; N; or —NMe—CH₂—) has been studied at 30°C and pH 7.4, with a spectrophotometric method using butyrylthiocholine as substrate. The inhibition was always reversible, although an apparent irreversible inhibition was sometimes observed with insufficiently purified inhibitors. Non-linear least-squares analysis of inhibition data showed 13 competitive inhibitors, 2 mixed and 1 non-competitive. The influence of the substituents borne by the phosphoramide molecule upon the competitive inhibition constant is approximately additive, allowing the attribution of a specific increment, Δ , to each substituent. There is no correlation between this increment Δ and Van der Waals volume V_w or the inductive parameters π and σ^{ϕ} . However, there is a slight correlation between the competitive inhibition constant and the partition coefficient (octanol/water) of the phosphoramides, suggesting participation of hydrophobic interactions.

L'inhibition de la butyrylcholinestérase de sérum de cheval par 16 phosphoramides aliphatiques OPXYZ (avec X, Y, Z = Me; NMe₂; NHet; NEt₂; N; N; N; ou —NMe—CH₂—), a été étudiée à 30°C et à pH 7.4 par une méthode spectrophotométrique avec la butyrylthiocholine comme substrat. L'inhibition est toujours réversible, bien qu'une inhibition irréversible ait parfois été observée avec des inhibiteurs insuffisamment purifiés. L'analyse des données, par la méthode des moindres carrés non linéaire, montre que 13 inhibiteurs sont du type compétitif, 2 mixtes et 1 non-compétitif. L'influence des substituants portés par la molécule de phosphoramide sur la constante d'inhibition compétitive est approximativement additive, ce qui permet d'attribuer un incrément spécifique Δ à chaque substituant. Il n'y a pas de corrélation entre cet incrément Δ et les volumes de van der Waals V_w ou les paramètres inductifs π et σ^{ϕ} ; cependant, il y a une faible corrélation entre la constante d'inhibition compétitive et le coefficient de partage (octanol/eau) des phosphoramides, ce qui suggère la participation d'interactions hydrophobes.

INTRODUCTION

Les propriétés cytostatiques des phosphoramides sont à la base de leur utilisation pour la stérilisation des insectes¹ ou la chimiothérapie anticancéreuse.² Il a été montré³ que des médicaments anticancéreux tels que le cyclophosphamide et certains phosphoramides dérivés de l'aziridine pouvaient inhiber la cholinestérase sérique, ce qui a permis d'interpréter certains des effets secondaires de ces médica-

*Authors to whom all correspondence should be addressed.

ments. Cependant, il ne semble pas qu'une étude systématique des propriétés anticholinestérasiques des phosphoramides, consacrée notamment à l'influence de la structure sur les propriétés inhibitrices, ait été réalisée, comme c'est le cas pour de nombreux composés organophosphorés de type esters.⁴⁻⁶

Nous rapportons ici nos résultats concernant l'inhibition de la cholinestérase sérique par une série de 16 phosphoramides aliphatiques dérivés de l'hexaméthylphosphotriamide (HMPT). Nous montrons qu'il s'agit d'inhibiteurs réversibles, le plus souvent compétitifs, et nous étudions l'influence de la structure sur les propriétés inhibitrices. Nous avons déjà étudié certains de ces produits par microcalorimétrie.⁴¹

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Réactifs

- Tampon constitué par une solution 0.1 M de Tris, amenée à pH 7.4 avec HCl.
- Butyrylcholinestérase de sérum de cheval (BuChE, EC 3.1.1.8) Sigma type IV-S, C 7512.
- Iodure de butyrylthiocholine (BuSCh), Sigma B3253.
- Acide 5,5'-dithio bis(2-nitro benzoïque), (DTNB) Sigma D8130, dont nous avons vérifié la pureté par spectroscopie UV et par le point de fusion ($F = 240^\circ\text{C}$; littérature: 239.7 – 240.3°C ⁷).
- Acide 5-thio 2-nitro benzoïque (TNB) préparé par réduction du DTNB par NaBH_4 dans $\text{NaOH } 10^{-5} \text{ M}$, selon Augustinsson et coll.⁸ (cristaux jaunes, $F = 146^\circ\text{C}$; littérature: 143 – 146°C ;⁹ spectres IR et UV en bon accord avec la littérature.)^{7,8}
- Hexaméthylphosphotriamide (HMPT) Prolabo, purifié, selon¹⁰
- Les autres phosphoramides ont été préparés et purifiés selon des méthodes précédemment décrites.¹¹⁻¹⁴

Etude spectrophotométrique de l'inhibition

On utilise ici une variante de la méthode d'Ellman,¹⁵ consistant à mesurer la vitesse initiale d'hydrolyse de la butyrylthiocholine à 30°C , sur des milieux réactionnels préparés en mélangeant (dans l'ordre):

- 3.4 mL de solution de DTNB (0.36 mM) contenant éventuellement l'inhibiteur;
- x mL de solution de BuSCh (≈ 30 mM);
- (0.1 – x) mL de tampon Tris;
- 0.1 mL de solution de BuChE (0.3 g/L);

toutes ces solutions étant préparées dans le tampon Tris (pH 7.4).

L'augmentation de D.O. à $\lambda = 412 \text{ nm}$ est suivie pendant 1 à 2 min, à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur thermostaté Beckman Acta C III. Les tracés obtenus étant linéaires, on en déduit la vitesse initiale v_0 de la réaction enzymatique, en utilisant le coefficient d'extinction molaire du TNB: $\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^{9,15}

La concentration initiale en substrat dans le milieu réactionnel, s_0 , a été limitée à 1 mM afin d'éviter l'activation par excès de substrat.¹⁶

Par ailleurs, nous avons réalisé les manipulations complémentaires suivantes:

—mesure de la vitesse d'hydrolyse de la BuSCh ($s_0 = 0.3$ mM) en présence de différentes concentrations en DTNB (0.167 à 1.67 mM).

—pour chaque inhibiteur, réalisation d'un témoin obtenu en incubant l'enzyme avec l'inhibiteur pendant 15 min avant l'ajout du substrat, ceci afin de détecter une éventuelle inhibition irréversible.

—étude de l'évolution dans le temps du spectre d'absorption du TNB (10^{-4} M dans le Tris), en présence de différentes concentrations en HMPT.

Recherche d'une corrélation entre l'activité inhibitrice et les propriétés physiques des phosphoramides

Par analogie avec les études consacrées aux esters phosphoriques,⁴⁻⁶ nous avons considéré trois types de propriétés physiques: la lipophilie des phosphoramides, et les effets inductifs et stériques des substituants portés par l'atome de phosphore.

—La lipophilie est caractérisée par le coefficient de partage P du phosphoramide dans le système *n*-octanol/eau:¹⁷

$$P = \frac{C_{\text{oct}}}{C_{\text{eau}}},$$

où C_{oct} et C_{eau} désignent les concentrations du phosphoramide dans les deux phases du système. Ces concentrations ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse sur Carbowax 20 M.

—Les effets inductifs des substituants sont exprimés par le paramètre π de Thomas,¹⁸ qui représente l'influence du substituant sur la fréquence de vibration $\nu_{\text{P=O}}$, et par le paramètre σ^ϕ de Kabachnik¹⁹ qui constitue une extension aux composés organophosphorés des paramètres σ de Hammett et σ^* de Taft. Les valeurs de ces paramètres ont été tirées de la littérature.¹⁸⁻²⁰

—L'encombrement stérique des substituants est exprimé par leur volume de Van der Waals V_w . Ce paramètre s'est révélé intéressant dans l'étude des relations structure-activité;²¹ nous avons calculé ces volumes à partir des rayons atomiques de Bondi²² et des distances interatomiques standard de Pople,²³ qui diffèrent très peu des distances expérimentales mesurées sur des composés voisins.²⁴⁻²⁶

Traitements des données

Les résultats des mesures cinétiques sont traités par la méthode graphique de Dixon²⁷ et par la méthode des moindres carrés non linéaires.²⁸ Cette dernière consiste, dans le cas présent, à ajuster une équation de vitesse du type:

$$v_0 = \frac{Vs_0}{K_m(1 + i\bar{K}_i) + s_0(1 + i\bar{K}'_i)} \quad (1)$$

où V désigne la vitesse maximale de la réaction enzymatique, K_m la constante de Michaelis, i la concentration totale en inhibiteur, \bar{K}_i et \bar{K}'_i les constantes d'inhibition compétitive et incompétitive (constantes d'association avec l'enzyme).

Le calcul est réalisé sur des calculateurs programmables Hewlett-Packard HP41C ou HP85, à l'aide de programmes écrits par nous, et disponibles sur demande auprès des auteurs. Pour chaque inhibiteur, on ajuste les quatre équations de vitesse correspondant aux cas où $\bar{K}'_i = 0$ (inhibition compétitive), $\bar{K}_i = 0$ (inhibition incompétitive), $\bar{K}_i = \bar{K}'_i$ (inhibition non compétitive), $\bar{K}_i \neq \bar{K}'_i \neq 0$ (inhibition mixte). On sélectionne l'équation conduisant à la variance résiduelle la plus faible, après avoir éliminé les cas où les valeurs de \bar{K}_i ou de \bar{K}'_i ne sont pas significativement différentes de zéro, d'après le test t .²⁹

La possibilité de comparer les constantes d'inhibition à zéro par un test statistique justifie le recours aux constantes d'association (\bar{K}_i, \bar{K}'_i) plutôt qu'aux constantes de dissociation (K_i, K'_i), plus classiques.

RESULTATS

Observations préliminaires

Nous n'avons pas constaté de modification de l'activité de la BuChE en présence de concentrations croissantes de DTNB, ce qui est en accord avec les résultats d'Augustinsson et Eriksson.³⁰ En revanche, nous avons observé une décoloration progressive des solutions de TNB en présence de fortes concentrations en HMPT. Ce phénomène semble correspondre à une réoxydation du TNB en DTNB, et pourrait être dû à la présence dans le HMPT de traces de peroxydes;³¹ on peut en rapprocher les résultats d'Augustinsson et Eriksson³⁰ qui ont observé une décoloration du TNB en présence de carbamates. Pour les faibles concentrations en HMPT, cette réaction est très lente et peut donc être négligée lors des mesures de vitesse initiale.

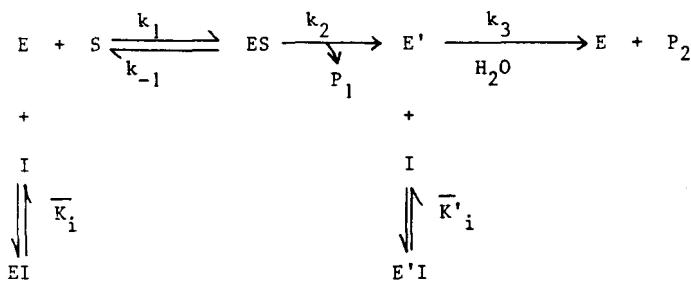
Réversibilité de l'inhibition

Pour les 16 phosphoramides étudiés ici, nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage d'inhibition après incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur: il s'agit donc d'inhibiteurs réversibles. Nous avons parfois observé une inhibition irréversible avec certains échantillons, mais ce phénomène a disparu après redistillation de l'inhibiteur et peut donc être attribué à des impuretés. Des résultats analogues ont été rapportés en ce qui concerne les esters et les thioesters phosphoriques.^{32,33}

Mécanisme de l'inhibition réversible

Un exemple de représentation graphique des résultats obtenus en coordonnées de Dixon est donné sur la Figure 1. L'application de la méthode des moindres carrés fournit les valeurs du Tableau I, qui montre que les 16 phosphoramides étudiés se répartissent en: 13 inhibiteurs compétitifs, 2 mixtes et 1 non-compétitif.

Ces résultats s'expliquent aisément si l'on considère que l'inhibiteur peut se fixer non seulement sur l'enzyme libre, mais aussi sur l'acyl-enzyme formé au cours de la réaction, selon le schéma suivant:¹⁶



où E désigne l'enzyme, S le substrat, E' l'acyl-enzyme, I l'inhibiteur, P₁ et P₂ les produits de la réaction.

L'équation de vitesse, à l'état stationnaire, correspondant à ce modèle, est:

$$v_0 = \frac{Vs_0}{K_m(1 + i\bar{K}_i) + s_0 \left[1 + i\bar{K}'_i \frac{k_2}{k_2 + k_3} \right]} \quad (2)$$

Pour les substrats tels que l'acétyl- ou la butyryl-choline, on peut admettre que $k_2 \gg k_3$,¹⁶ de sorte que l'équation précédente se réduit pratiquement à l'équation (1).

Si l'on considère que le site actif des cholinestérases est constitué de deux parties: un site estérasique (qui fixe le groupement ester du substrat) et un site anionique (qui fixe le groupement ammonium quaternaire), on peut admettre que dans le complexe

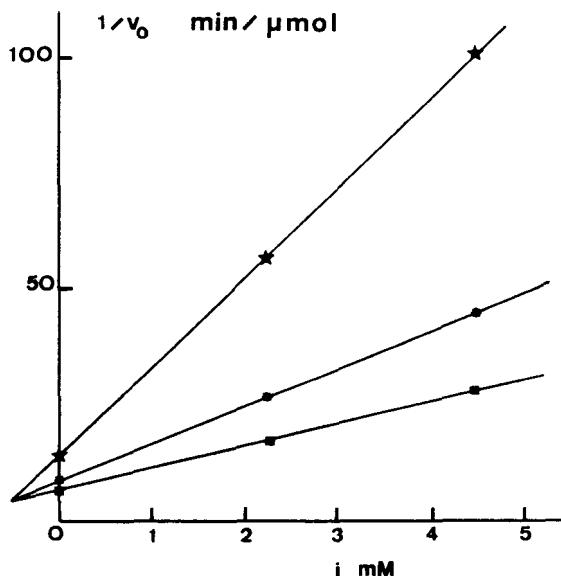


FIGURE 1 Inhibition de la butyrylcholinestérase par le phosphoramide OP(NMe₂)(N-CH₂-)₂. Représentation graphique selon Dixon des variations de la vitesse initiale v_0 d'hydrolyse de la butyrylthiocholine (mesurée par la méthode d'Ellman) en fonction de la concentration totale i en inhibiteur, à pH 7.4 et 30°C. Concentrations initiales en substrat: (★) 0.165 mM; (*) 0.413 mM; (■) 0.828 mM.

TABLEAU I

Paramètres caractérisant l'inhibition de la butyrylcholinestérase par les phosphoramides aliphatiques

| Composé | \bar{K}_i (mM ⁻¹) | \bar{K}'_i (mM ⁻¹) | log P |
|---------|---------------------------------|----------------------------------|-------|
| | 0.0661 ± 0.0052 | 0.0661 ± 0.0052 | |
| | 0.078 ± 0.017 | | |
| | 0.122 ± 0.012 | 0.018 ± 0.005 | |
| | 0.131 ± 0.004 | | |
| | 0.187 ± 0.010 | | 0.089 |
| | 0.276 ± 0.019 | | -0.67 |
| | 0.287 ± 0.010 | | 0.021 |
| | 0.361 ± 0.035 | | 0.66 |
| | 0.91 ± 0.12 | | |
| | 1.21 ± 0.061 | | 0.82 |
| | 1.69 ± 0.063 | 0.313 ± 0.035 | 1.88 |
| | 1.88 ± 0.21 | | 2.53 |
| | 2.09 ± 0.13 | | 2.39 |
| | 3.51 ± 0.53 | | |
| | 5.17 ± 0.45 | | 1.67 |
| | 12.3 ± 1.2 | | |

\bar{K}_i , \bar{K}'_i : constantes d'inhibition compétitive et incompétitive, déterminées par régression non linéaire, selon les protocoles décrits dans "Matériels et Méthodes". Les résultats sont donnés sous la forme moyenne ± écart-type. L'absence de valeur pour \bar{K}'_i signifie que ce paramètre n'a pas été trouvé statistiquement significatif. P: coefficient de partage du phosphoramide dans le système *n*-octanol/eau, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

Et l'inhibiteur se fixe sur le site estérasique, alors que dans le complexe E'I il se fixe sur le site anionique, qui est seul libre dans l'acyl-enzyme. Les phosphoramides auraient donc moins d'affinité pour le site anionique que pour le site estérasique, puisque la valeur de \bar{K}'_i est soit inférieure à celle de \bar{K}_i (inhibiteurs mixtes), soit non mesurable (inhibiteurs compétitifs). Le composé trouvé non-compétitif (Tableau I) fait toutefois exception à cette règle, probablement du fait de sa structure particulière.

Recherche d'une relation linéaire d'enthalpie libre

Nous avons cherché à caractériser l'influence des substituants, portés par le groupe phosphoryle, sur la constante d'inhibition compétitive \bar{K}_i , au moyen d'une relation linéaire d'enthalpie libre du type:

$$\log \frac{\bar{K}_i}{\bar{K}'_i^0} = \sum_k n_k \Delta_k \quad (3)$$

avec \bar{K}_i : constante d'inhibition compétitive d'un composé quelconque;

\bar{K}'_i^0 : constante d'inhibition compétitive du HMPT (choisi comme composé de référence);

Δ_k : incrément attribué au substituant k (par hypothèse, $\Delta_k = 0$ pour—NMe₂);
 n_k : nombre de substituants k entrant dans la structure du composé étudié.

Nous avons déterminé les Δ_k par régression linéaire multiple de $\log(\bar{K}_i/\bar{K}_i^0)$ sur les n_k , en utilisant les 15 inhibiteurs compétitifs ou mixtes; le composé cyclique OPMe(NMe—CH₂)₂ a été exclu de l'analyse en raison de son mode d'action particulier.

Les valeurs obtenues figurent dans le Tableau II. La Figure 2 montre que la relation linéaire est approximativement vérifiée, sauf pour le composé OP(NMe₂)₂ (N) qui constitue un point aberrant.

Inhibition et propriétés physiques

Les valeurs des paramètres physico-chimiques étudiés sont groupées dans les Tableaux I et II. Le Tableau III montre les corrélations observées entre les paramètres d'inhibition (\bar{K}_i ou Δ) et les paramètres physico-chimiques choisis par nous pour caractériser les phosphoramides. On constate que la meilleure corrélation est obtenue avec le coefficient de partage P. Ceci suggère que la formation du complexe enzyme—inhibiteur est essentiellement sous la dépendance des interactions hydrophobes. On observe cependant que, contrairement à la constante d'inhibition, le coefficient de partage ne varie pas de façon régulière avec la structure des phosphoramides. Ceci contraste avec le caractère additif de ce paramètre observé sur de nombreux composés organiques.³⁴

DISCUSSION

La présente étude fait apparaître, entre les propriétés anticholinestérasiqes des phosphoramides et celles des autres composés organophosphorés précédemment étudiés par d'autres auteurs, un certain nombre de similitudes et de différences que nous allons analyser.

TABLEAU II
 Propriétés caractéristiques des substituants portés par les phosphoramides

| Substituant | Δ | V_w (Å ³) | π | σ^ϕ |
|---|----------|-------------------------|-------|---------------|
| NHEt | -0.24 | 55.4 | 2.0 | -1.36 |
| N  | -0.14 | 44.3 | 2.2 | |
| NMe ₂ | 0 | 55.7 | 2.4 | -1.22 |
| Me | 0.15 | 26.3 | 2.1 | -0.96 |
|  | 0.22 | 100 | 5.1 | |
|  | 0.23 | 61.2 | 2.56 | |
| NEt ₂ | 0.32 | 89.5 | 2.4 | -1.28 |
|  | 0.50 | 78.1 | 2.44 | |
|  | 0.61 | 94.9 | 2.3 | -1.30 |

Δ : incrément caractérisant l'influence du substituant sur l'inhibition de la butyrylcholinestérase, calculé d'après la relation (3). V_w : volume de Van der Waals du substituant. π , σ^ϕ : paramètres inductifs.

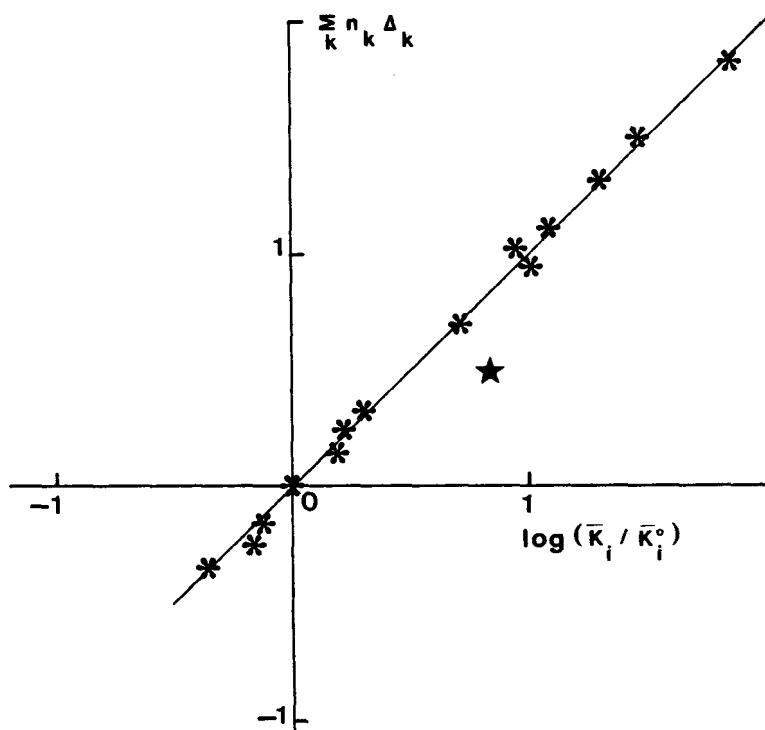


FIGURE 2 Validité de la relation linéaire d'enthalpie libre pour la constante d'inhibition compétitive \bar{K}_i . En abscisses: valeurs expérimentales. En ordonnées: valeurs calculées d'après la relation (3) et les incrémentes Δ du Tableau II. La droite correspond à l'équation (3). ★, point aberrant OP(NMe₂)₂(N~~Cl~~).

TABLEAU III
Corrélations entre l'inhibition de la butyrylcholinestérase et les propriétés physiques des phosphoramides

| Paramètre d'inhibition | Paramètre physique | Coefficient de corrélation | Nombre de points |
|------------------------|--------------------|----------------------------|------------------|
| $\log \bar{K}_i$ | $\log P$ | 0.842 | 9 |
| Δ | V_w | 0.631 | 9 |
| Δ | π | 0.151 | 9 |
| Δ | σ^* | 0.040 | 5 |

1. L'affinité des phosphoramides pour l'enzyme (mesurée par la valeur de \bar{K}_i) est comparable à celle des esters organophosphorés.⁴ Elle est en général assez faible, ce qui empêche de considérer ces molécules comme des analogues de l'état de transition de la réaction enzymatique.³⁵

2. Contrairement à ce que l'on observe avec de nombreux esters, l'inhibition par les phosphoramides est réversible. Ceci est en accord avec la grande stabilité de ces molécules en milieu neutre ou alcalin:³⁶ il n'y a pas de coupure de la liaison P—N dans nos conditions opératoires.

3. Les phosphoramides peuvent former un complexe avec l'acyl-enzyme. Ce phénomène, souvent négligeable, a pu dans un cas être suffisamment important pour donner lieu à une inhibition non-compétitive. Ceci contraste avec l'hypothèse couramment admise d'une seule interaction enzyme-inhibiteur.³⁷ Remarquons cependant que Brestkin et Godovikov,³⁸ lors de leur analyse de l'inhibition "combinée" (à la fois réversible et irréversible) observée avec certains composés organophosphorés, ont été conduits à postuler l'existence d'un complexe acyl-enzyme/inhibiteur. Ce phénomène n'est pas surprenant si l'on considère que l'acyl-enzyme a tendance à s'accumuler durant l'hydrolyse des esters de la choline, car pour ces substrats l'étape limitante de la réaction est constituée par la désacylation de l'acyl-enzyme.¹⁶

4. L'existence d'une relation linéaire d'enthalpie libre suggère la participation des trois substituants de l'atome de phosphore à la formation du complexe enzyme-inhibiteur, ce qui rappelle les hypothèses faites par Järv et coll.³⁹ pour l'acétylcholinestérase. Le caractère additif de cette relation permet de penser que les trois substituants possèdent, dans le complexe, des orientations similaires, ce qui ne semble pas être le cas en solution.²⁰ Il y aurait donc un changement de conformation de la molécule d'organophosphoré du fait de sa liaison avec l'enzyme, ce qui expliquerait les faibles valeurs des \bar{K}_i . On retrouve ainsi une hypothèse classique de l'enzymologie: une partie de l'énergie libre de fixation est utilisée pour déformer la molécule de substrat.

5. L'activité inhibitrice augmente avec la lipophilie des phosphoramides, ce qui est conforme aux résultats obtenus pour les autres inhibiteurs organophosphorés⁴⁻⁶.

Quel que soit le mécanisme exact de l'inhibition, les propriétés anti-cholinestérasiqes des phosphoramides, de par leur caractère réversible, semblent trop faibles pour pouvoir expliquer la toxicité de ces molécules. Il est probable qu'une action sur le matériel génétique, manifestée notamment par les propriétés mutagènes,⁴⁰ joue ici un rôle prépondérant. En particulier, les propriétés pesticides de ces produits semblent surtout imputables à leur action stérilisante.¹

La constante d'inhibition \bar{K}_i de certains des inhibiteurs compétitifs étudiés ici a fait l'objet d'une détermination par une méthode microcalorimétrique;⁴¹ les résultats que nous avons obtenus par ces deux techniques sont en bon accord.

BIBLIOGRAPHIE

1. G. C. Labrecque et R. L. Fye, *Mutat. Res.*, **47**, 99 (1978).
2. G. Zon, *Progr. Med. Chem.*, **19**, 205 (1982).
3. D. Lalka et T. J. Bardos, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 455 (1975).
4. U. Langel et J. Järv, *Biochim. Biophys. Acta.*, **525**, 122 (1978).
5. F. Barbato, B. Capello, C. Silipo et A. Vittoria, *Il Farmaco, Ed. Sc.*, **37**, 519 (1982).
6. A. Chiriac, Z. Simon et R. Vilceanu, *Stud. Biophys.*, **51**, 183 (1975).
7. P. W. Riddles, R. L. Blakeley et B. Zerner, *Anal. Biochem.*, **94**, 75 (1979).
8. K. B. Augustinsson, B. Axenfors et M. Elander, *Anal. Biochem.*, **48**, 428 (1972).
9. R. M. Silverstein, *Anal. Biochem.*, **63**, 281 (1975).
10. J. Y. Gal et T. Yvernault, *Bull. Soc. Chim. France*, **1971**, 2770.
11. T. Yvernault, G. Yvernault et J. C. Bollinger, *C. R. Acad. Sci. (Paris), Ser. C*, **287**, 519 (1978).
12. J. C. Bollinger, G. Yvernault, T. Yvernault, A. Julg et M. Rajzmann, *J. Mol. Struct.*, **69**, 273 (1980).
13. J. C. Bollinger, R. Faure et T. Yvernault, *Canad. J. Chem.*, **61**, 328 (1983).
14. J. C. Bollinger, G. Yvernault et T. Yvernault, *Thermochim. Acta.*, **60**, 137 (1983).
15. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres et R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88 (1961).

16. H. Eriksson et K. B. Augustinsson, *Biochim. Biophys. Acta*, **567**, 161 (1979).
17. A. Leo, C. Hansch et D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971).
18. L. C. Thomas et R. A. Chittenden, *Spectrochim. Acta*, **20**, 467 (1964).
19. T. A. Mastryukova et M. I. Kabachnik, *Russian Chem. Rev.*, **38**, 795 (1969).
20. J. C. Bollinger, Thèse Sciences Physiques, Limoges (1983).
21. A. T. Balaban, A. Chiriac, I. Motoc et Z. Simon, *Steric Fit in Quantitative Structure-Activity Relations (Lecture Notes in Chemistry, vol. 15)*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1980).
22. A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, **68**, 441 (1964).
23. M. Grafeuil, J. F. Labarre et C. Leibovici, *J. Mol. Struct.*, **22**, 97 (1974).
24. D. Cremer, O. V. Dorofeeva et V. S. Mastryukov, *J. Mol. Struct.*, **75**, 225 (1981).
25. K. Kalcher, W. Kosmus et K. Faegri, *Spectrochim. Acta*, **34A**, 889 (1981).
26. D. Gonbeau, M. Sanchez et G. Pfister-Guillouzo, *Inorg. Chem.*, **20**, 1966 (1981).
27. M. Dixon, *Biochem J.*, **55**, 170 (1953).
28. D. W. Marquardt, *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, **11**, 431 (1963).
29. T. Bartfai et B. Mannervik, *F.E.B.S. Letters*, **26**, 252 (1972).
30. K. B. Augustinsson et H. Eriksson, *Biochem. J.*, **139**, 123 (1974).
31. J. Y. Gal et T. Yvernault, *Bull. Soc. Chim. France*, **1972**, 839.
32. M. R. Gumbmann et S. N. Williams, *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 76 (1970).
33. G. J. Hart et R. D. O'Brien, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 540 (1975).
34. G. G. Nys et R. F. Rekker, *Eur. J. Med. Chem.*, **9**, 361 (1974).
35. Y. Ashani et B. S. Green, *Studies in Organic Chemistry*, **10**, 169 (1981).
36. D. F. Heath et P. Casapieri, *Trans. Faraday Soc.*, **47**, 1093 (1951).
37. A. R. Main, *Pharmacol. Ther.*, **6**, 579 (1979).
38. A. P. Brestkin et N. N. Godovikov, *Russian Chem. Rev.*, **47**, 859 (1978).
39. J. Järvinen, A. Aaviksaar, N. Godovikov et D. Lobanov, *Biochem. J.*, **167**, 823 (1977).
40. J. Ashby, J. A. Styles et D. Paton, *Br. J. Cancer*, **38**, 418 (1978).
41. J. Debord, M. Labadie, J. C. Bollinger et T. Yvernault, *Thermochim. Acta*, **66**, 323 (1983).