

Détection fluorescente et/ou colorimétrique des organophosphorés à base de butyrylcholinestérase

DetectOP_BChE

anr[©] agence nationale de la recherche

Appel : AAPG

Année : 2018

Instrument : PRC

Contact : pierre-yves. renard@univ-rouen.fr

COORDINATEUR : Pierre-Yves RENARD, COBRA UMR 6014 CNRS Rouen

PARTENAIRES : Florian NACHON, IRBA, BrétignyOrge
Anthony ROMIEU, ICMUB UMR 6302 CNRS Dijon

ANR-18-CE39-0014 Résumé :

Détecter la présence des neurotoxiques organophosphorés (OP) via leur réaction spécifique et rapide avec la Butyrylcholinestérase, soit de façon non spécifique (outil d'alerte), grâce à un réactivateur profluorescent de l'enzyme, soit spécifique (outil d'identification) grâce à un profluorophore réagissant avec le groupe partant.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

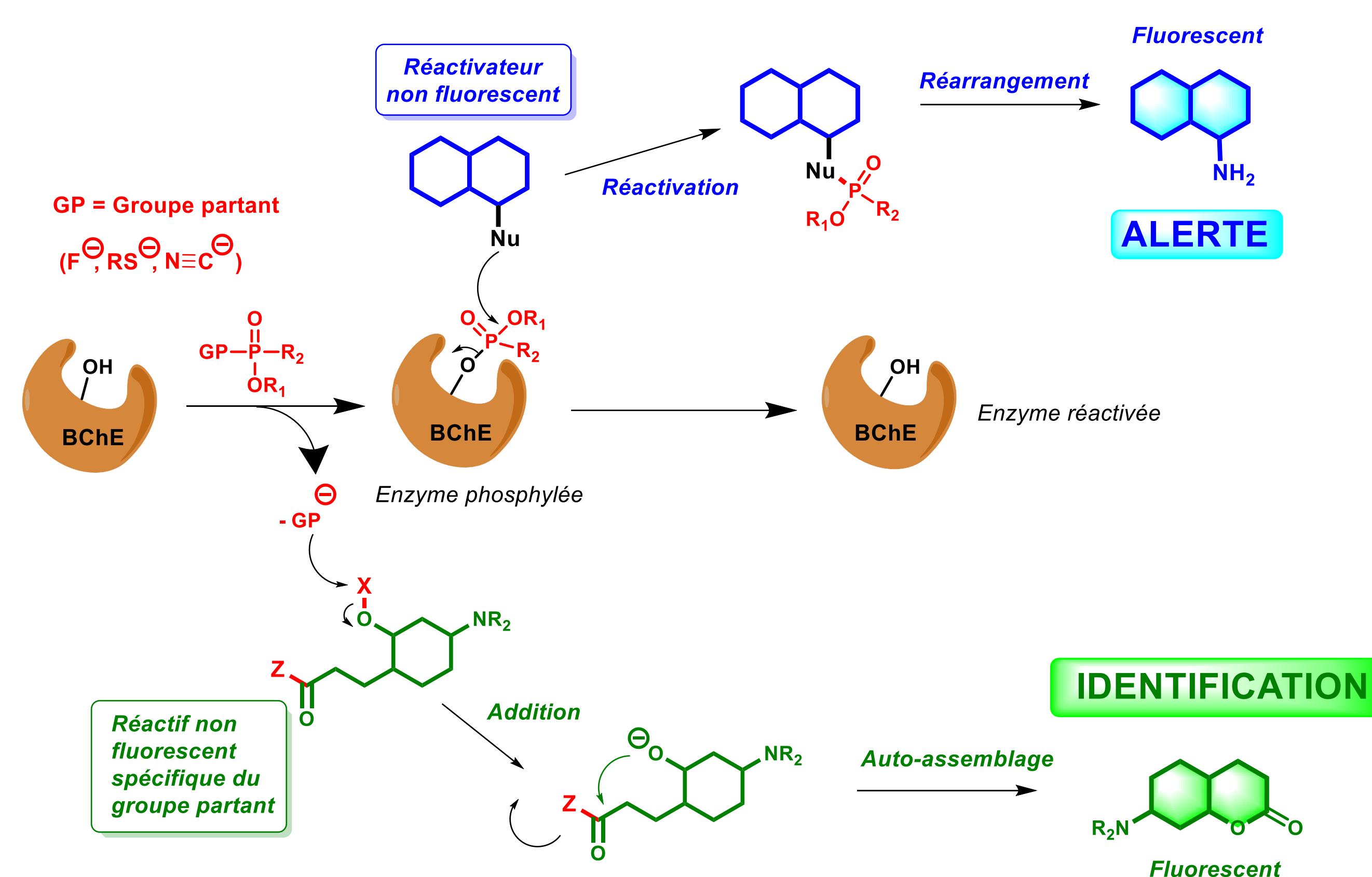
Malgré la menace que représente les neurotoxiques organophosphorés (OP), aucune des stratégies développées à ce jour n'a conduit à un système de détection à la fois sensible, rapide, portable, robuste, fiable, universel et visuel. Le projet DetectOP-BChE vise à mettre au point un tel dispositif fondé sur la Butyrylcholinestérase (BChE), une des cibles biologiques des OP, en tirant partie de sa spécificité, de sa cinétique de réaction et de sa sensibilité aux OP. Deux outils complémentaires sont visés, un **système d'alerte** non spécifique d'un OP en particulier, et un outil avancé pour **identifier la nature** des OP responsables de l'alerte.

MÉTHODOLOGIE ET RESULTATS

La stratégie est basée sur le concept de pro-fluorescence/colorimétrie sensible, visuelle et simple d'utilisation, associée aux caractéristiques des cholinestérases en tant que biomarqueurs rapides et sélectifs d'une exposition aux OP. La BChE a été choisie comme enzyme cible, de par la facilité de sa production sous forme d'enzyme recombinante, et sa plus grande stabilité. Elle est phosphorylée par **tous** les OP, avec une cinétique sans comparaison avec la réaction de ces OP avec les sondes fluorescentes actuellement proposées dans la littérature ($K_i > 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), toutes fondées sur une fonction nucléophile capable d'attaquer l'atome de phosphore électrophile des OP. De plus, l'utilisation de cette enzyme assure une meilleure sélectivité (moins de faux positifs), car seuls les OP sont capables de la phosphoryler.

Le **dispositif d'alerte** est fondé sur des réactivateurs de cholinestérases capables de déphosphoryler l'enzyme. Pour assurer une détection sensible et efficace, la phosphorylation du réactivateur doit conduire à une différence significative de sa fluorescence. La première piste mise en œuvre a été d'utiliser des 2-hydroxy aldoximes aromatiques, car leur phosphorylation conduit à la formation d'un isoxazole, modifiant la répartition électronique sur l'aromatique. Si nous avons pu mettre en évidence des 2-hydroxyaloximes capables de déphosphoryler la BChE, la formation de l'isoxazole est immédiatement suivie par un réarrangement de Kemp, conduisant à un 2-hydroxy nitrile, dont les propriétés chromogéniques sont très proches de l'oxime de départ, ne permettant pas d'obtenir une différence de signal suffisante. En revanche, l'utilisation d'acides hydroxamiques s'est révélée beaucoup plus satisfaisante, car leur phosphorylation conduit à un réarrangement de Lossen. L'acide hydroxamique est alors transformé en aniline, avec modification de la fluorescence. Nous travaillons actuellement sur une modulation de la structure de ces acides hydroxamiques pour accélérer la cinétique du réarrangement à pH physiologique.

Le **dispositif d'identification** est fondé sur des sondes fluorescentes capables de détecter le groupe partant libéré lors de la phosphorylation de l'enzyme. Cette stratégie a été validée pour la détection des agents V, et plus précisément du VX via la phosphorylation de la BChE en utilisant une sonde profluorescente capable de détecter le thiol libéré. La sonde



que nous avons utilisé est une sonde profluorescente utilisée en remplacement du réactif d'Ellman (sensibilité améliorée de 2 ordres de grandeur). Cette sonde est fondée sur un motif 7-hydroxycoumarine comme cœur fluorescent, possédant un accepteur de Michael en position 3 de la coumarine. L'accepteur de Michael éteint la fluorescence de cette coumarine via un mécanisme de transfert d'électron photoinduit (TeP). L'addition d'un thiol sur cet accepteur de Michael restaure la fluorescence de la coumarine. La limite de détection est en cours d'évaluation.

Afin d'améliorer cette limite de détection, une stratégie fondée sur la stratégie de fluorophores auto-assemblés est également mise en place. Cette stratégie permet de limiter le bruit de fond, puisque c'est la réaction avec le groupe partant qui permet de former le cœur fluorescent. Une première série de sondes conduisant à la formation de 7-diéthylaminocoumarines a été obtenue et évaluée, la meilleure étant fondée sur un électrophile de type 2,4-dinitrophenyl sulfonate. Elle s'est en revanche révélée moins efficace que la sonde fondée sur une extinction de fluorescence par TeP. Nous sommes en train de synthétiser des sondes profluorescentes auto-assemblées possédant également un accepteur de Michael comme entité réagissant avec les thiols.

Pour la détection des fluorures (agents G et Novichoks), le groupement réactif choisi est un éther silylé positionné sur un phénol. Cependant, la solvataion du fluorure diminue drastiquement sa réactivité avec les éthers silylés dans l'eau. Le compromis entre stabilité de la sonde et réactivité avec le fluorure s'est révélé délicat à trouver, mais en ajoutant un motif ammonium quaternaire comme élément fonctionnel clé nous avons conçu la première sonde reposant sur le principe d'assemblage covalent, et opérationnelle pour la détection des ions fluorures en milieu aqueux.

Publication

Quesneau, V.; Roubinet, B.; Renard, P.-Y.; Romieu, A., *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, Article 151279



25 et 26
JANVIER

2022



UNIVERSITÉ DE BORDEAUX