

Les toxines tétaniques et botuliniques sont des métallopeptidases à zinc : mécanismes moléculaires et inhibition de leur neurotoxicité

par Fabrice Cornille et Bernard P. Roques

Pharmacochimie Moléculaire et Structurale (INSERM et CNRS)

Reçu le 9 novembre 1999

RÉSUMÉ

L'extrême toxicité des toxines tétaniques (TeNT) et botuliniques (BoNT) est reliée à leur activité de métallopeptidases à zinc capables de cliver des protéines cellulaires impliquées dans l'exocytose des neurotransmetteurs. Il n'existe à ce jour aucune thérapie sélective contre le tétanos ou le botulisme, de même que contre une éventuelle dissémination de ces toxines. Nous avons établi les séquences minimales des substrats de TeNT et BoNT et mis au point un dosage fluorescent très sensible et automatisable. La synthèse

en phase solide de la synaptobrevine (93 acides aminés) et de ses fragments a permis de démontrer que les toxines clostridiales possèdent un mécanisme enzymatique de type allostérique, premier exemple dans le cas des métallopeptidases. A partir de ces résultats, une stratégie de développement d'inhibiteurs de l'activité enzymatique de TeNT et BoNT a été développée, passant par la chimie combinatoire et aboutissant aux premiers inhibiteurs puissants de ces toxines.

SUMMARY Tetanus and botulinum toxins are zinc metalloproteases: molecular mechanisms and inhibition of neurotoxicity

The very high toxicity of tetanus neurotoxin (TeNT) and botulinum neurotoxin (BoNT) are related to their nature of zinc metallopeptidases able to selectively cleave small proteins involved in neurotransmitters exocytosis. At this time, there is no efficient and selective therapy towards tetanus and botulism as well as protection against a possible spreading of the toxins. We have therefore investigated the minimum sequences of TeNT and BoNT substrates allowing an efficient and simple fluorescent dosage of

the enzymatic activity to be developed. Using synaptobrevin (93 amino acids) as substrate of TeNT and several fragments synthesised by solid phase method, we have shown that the clostridial neurotoxins behave as allosteric-type enzymes. This is the first example in zinc metallopeptidases. Based on these results a strategy, including the use of combinatorial chemistry, was carried out issuing in the design of the first potent inhibitors of TeNT and BoNT.

INTRODUCTION

L'infection par certaines bactéries reste une menace pour l'Homme du fait de la production de toxines variées. Malgré les programmes de vaccination, ces infections bactériennes demeurent au rang des premières causes de mortalité dans le monde : leurs victimes se comptent encore par millions. Parmi les nombreuses toxines bactériennes (diphtérique, cholérique, pertussique...), la toxine tétanique (TeNT) et les toxines botuliniques (BoNT) sont responsables de deux maladies : le

tétanos et le botulisme qui se caractérisent par des paralysies sévères, souvent mortelles. Par ailleurs, plusieurs études (Le Monde du 12 mars 1998) démontrent que les sociétés industrielles sont démunies devant d'éventuelles utilisations « terroristes militaires » d'agents biologiques dont font partie ces toxines, mortelles à doses infinitésimales. Enfin, il est important d'observer que la toxine botulique est utilisée en neurologie mais que son usage reste délicat du fait de sa puissante toxicité. C'est du reste celle-ci qui a orienté les recherches sur le mécanisme d'action des neurotoxines avec, en 1994, la

démonstration qu'elles agissaient par le biais d'activités de type métallopeptidase à zinc, capables d'hydrolyser et donc d'inactiver de manière sélective des petites protéines impliquées dans l'exocytose de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine ou l'acide g-aminobutyrique, GABA (1). Il était dès lors possible d'envisager une stratégie de développement d'inhibiteurs de ces « neurotoxines enzymatiques » en suivant des stratégies mises au point dans notre laboratoire lors du développement d'inhibiteurs sélectifs ou mixtes de métallopeptidases à zinc physiologiques telles que l'endopeptidase neutre (NEP), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) ou les aminopeptidases N ou A, certains de ces inhibiteurs étant désormais sur le marché ou en essais cliniques (2). Pour ce, il était nécessaire de résoudre plusieurs problèmes : *i*) déterminer la spécificité de ces neurotoxines et en particulier la séquence minimale hydrolysable à une vitesse convenable ; *ii*) mettre au point un dosage utilisable dans un tri à haut-flux d'inhibiteurs ; *iii*) étudier à l'échelle moléculaire le mécanisme d'action de ces neurotoxines ; *iv*) envisager des approches rationnelles dans le développement d'inhibiteurs. Ces différents points seront brièvement rapportés dans cet article.

STRUCTURE ET ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES TOXINES CLOSTRIDIALES

Ces neurotoxines sont des protéines bicaténaires d'environ 150 kDa composées d'une chaîne lourde (100 kDa) reliée par un pont disulfure à une chaîne légère (50 kDa). La chaîne lourde participe à la liaison aux terminaisons nerveuses, à l'internalisation et à la translocation de la chaîne légère à l'intérieur du cytosol ; celle-ci, une fois réduite, est responsable de l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs (glycine, GABA) ou excitateurs (acétylcholine), ce qui explique les paralysies engendrées (revue dans 3).

Les neurotoxines botuliques et la toxine tétanique sont de loin les toxines les plus puissantes connues. La dose létale chez la Souris est proche de 0,1 ng/kg, soit environ 1 million de fois inférieure aux concentrations léthales des poisons communs les plus puissants, tels que le cyanure ou le curare. Cette extrême toxicité a permis d'émettre les premières hypothèses sur le mécanisme d'action de ces toxines. Premièrement, du fait que très peu de molécules – moins de 10^{13} - 10^{14} – étaient capables de tuer un animal, il fallait que les cellules cibles de ces toxines soient hautement spécifiques et physiologiquement essentielles et que la toxine interagisse avec une très haute affinité. Deuxièmement, il était difficilement imaginable que ces toxines agissent au niveau moléculaire de façon stoechiométrique, il fallait donc envisager un système d'amplification. Il était logique d'envisager que ces toxines agissent en tant qu'enzymes puisque c'est le cas d'autres toxines voisines, responsables par exemple du choléra ou de la diphtérie.

En fait, en 1994, Montécucco *et al.* ont montré que les chaînes légères des toxines clostridiales appartiennent à la famille des endopeptidases à zinc (4). En effet, elles contiennent dans leur séquence primaire le motif consensus HEXXH caractéristique de cette famille d'enzymes où les deux histidines sont impliquées dans la chélation de l'atome de zinc et le glutamate dans l'acte catalytique (5). Les chaînes légères des toxines botuliques de sérotypes A, E, et C hydrolysent de façon spécifique deux protéines de la membrane présynaptique, la SNAP 25 pour les deux premières et la syntaxine pour la dernière. La BoNT/B, D, F et G ainsi que la toxine tétanique clivent la synaptobrevine, protéine membranaire des petites vésicules synaptiques (6, 15) (Fig. 1).

Le clivage de l'une quelconque de ces protéines inhibe la formation d'un complexe protéique synaptobrevine/SNAP-25/syntaxine responsable du phénomène de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique et d'exocytose des neurotransmetteurs.

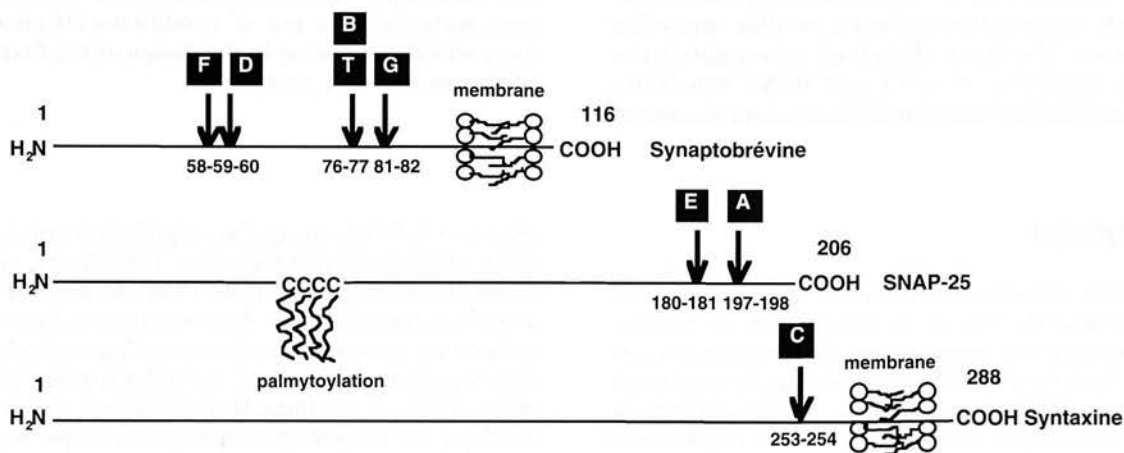


FIG. 1. – Schéma montrant les différentes cibles des toxines botuliques et de la toxine tétanique ainsi que le positionnement relatif des sites de clivage. T = toxine tétanique ; B-G : différents types de toxines botuliques.

DÉTERMINATION ET SYNTHÈSE D'UN SUBSTRAT MINIMAL POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA TOXINE TÉTANIQUE

Les constantes cinétiques d'hydrolyse du fragment cytosolique de la synaptobrevine II humaine synthétisée dans le laboratoire ont été mesurées en utilisant la chaîne légère préalablement purifiée selon un protocole préalablement décrit (7) légèrement modifié (8) ($K_m = 527 \mu M$, $V_{max} = 182 \text{ pmol. min}^{-1} \mu g^{-1}$ et $k_{cat} = 9,1 \text{ min}^{-1}$). Étant donné les faibles vitesses de clivage un tel test nécessite une assez forte concentration de substrat ($10 \mu M$), ce qui est peu compatible avec l'utilisation d'un substrat de grande taille. Nous avons donc cherché à déterminer le substrat minimal de la toxine tétanique. Nous avons pour cela synthétisé de nombreux analogues en délétant, du côté N- et C-terminal, des portions de synaptobrevine. Le peptide minimal hydrolysé par la TeNt est le peptide SybII 39-88 (Fig. 2).

Toute délétion supplémentaire de quelques acides en C ou N-terminal diminue respectivement la vitesse d'hydrolyse d'un facteur 50 et d'un facteur supérieur à 100. Pour mettre au point un dosage simple, nous avons décidé de synthétiser et d'incorporer un acide aminé fluorescent, la pyrénylalanine en position C-terminale du peptide SybII 39-88. Pour réaliser la synthèse du substrat avec ce chromophore, nous avons préparé

l'acide aminé fluorescent à la fois protégé en Fmoc et optiquement pur. Pour effectuer la synthèse énantiosélective, nous avons utilisé comme source de chiralité le camphorsultame décrit par Oppolzer (9). Le peptide ainsi généré est un excellent substrat pour la chaîne légère de toxine tétanique puisqu'il présente un rapport K_{cat}/K_m 4 fois meilleur que le peptide initial Syb 39-88. On se rapproche des valeurs du substrat total SybII 1-93. Ceci peut être expliqué par la nature du groupement pyrénylalanine : son caractère hydrophobe et sa taille étant susceptibles de mimer les deux groupements Trp 89,90 dont le rôle semble important pour la reconnaissance du peptide 1-93 par la toxine. Avec de petites cartouches Sep-Pak-Vac C18, plus de 99 % du métabolite SybII 77-88 sont élués (8). Ceci offre donc la possibilité (à l'aide d'un système commercialisé permettant l'élution simultanée de 24 cartouches) d'automatiser et d'analyser de très nombreux composés.

L'HYDROLYSE DE LA SYNAPTOBRÉVINE PAR LA TOXINE TÉTANIQUE EST COOPÉRATIVE ET DÉPENDANTE DE L'OCCUPATION D'EXOSITES

Nos travaux ainsi que ceux de la littérature ont permis de conclure que : i) ces neurotoxines clivent de façon spécifique une seule liaison alors que de nombreuses

A	Peptide Sequences						Velocity ($\mu\text{mol. min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) $\pm \text{SEM (n = 3)}$
	1	39	45	82	88	93	
				TeNT			
S 1-93	MSATAATAPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSSNRRLQQTQAQ	VDEVVD	IMRVNVDKVLERDQKLS	ELDDRADALQAGASQFETSAA	KLKRKY	WWKNL	88.2 $\pm$ 0.3
S 39-88		VDEVVD	IMRVNVDKVLERDQKLS	ELDDRADALQAGASQFETSAA	KLKRKY		29.9 $\pm$ 0.9
S 39-82		VDEVVD	IMRVNVDKVLERDQKLS	ELDDRADALQAGASQFETSAA			0.62 $\pm$ 0.01
S 45-88			IMRVNVDKVLERDQKLS	ELDDRADALQAGASQFETSAA	KLKRKY		not determined

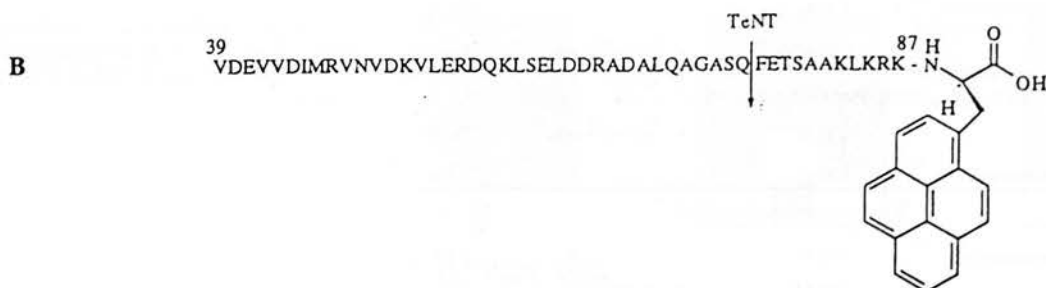


FIG. 2.

autres copies de cette séquence de clivage existent dans le substrat (ou bien dans d'autres protéines neuronales colocalisées); ii) ces neurotoxines nécessitent des substrats de taille élevée de 30 à 50 acides aminés. La synaptobrevine n'ayant pas de structure spatiale en solution démontrée par des études RMN (6), il paraissait logique d'envisager des interactions avec la chaîne légère à distance du site de clivage, dont l'existence avait été proposée par des expériences préliminaires (10).

Effet potentialisateur des peptides S1 et S2 sur le clivage par la toxine tétanique

Le peptide Syb 32-93 est hydrolysé par la toxine tétanique mais, dans les mêmes conditions, les peptides Syb 50-93 ou Syb 32-81, auxquels ils manquent les domaines S1 et S2, ne le sont pas (Fig. 3). Nous avons donc cherché à déterminer si l'addition de peptides correspondant aux régions délétées (32-50) et (82-93) était capable de faire réapparaître un clivage enzymatique par la TeNT. En effet, 1 mM de S1 et 1 mM de S2 potentialisent respectivement l'hydrolyse des peptides Syb 50-93 et Syb 32-81. Les différentes valeurs sont reportées dans la Figure 3.

La potentialisation de Syb 32-81 par S2 est particulièrement importante avec un facteur d'au moins 150 sur la vitesse d'hydrolyse. En revanche, aucune modification de la cinétique d'hydrolyse du peptide Syb 32-93 n'est observée lorsqu'on ajoute 1 mM de S1 ou de S2. Au vu de ces résultats, nous avons synthétisé le peptide Syb 56-81 correspondant au site de clivage de la toxine tétanique et dépourvu des deux fragments S1 (Syb 27-55) et S2 (Syb 82-93). Ce peptide seul n'est pas clivé par la toxine tétanique mais se retrouve hydrolysé en présence à la fois de S1 et S2 à une concentration de 1 mM. En revanche, ce clivage n'est pas retrouvé lorsque seulement S1 ou S2 est présent. Ce dernier résultat, décisif, montre que des fragments éloignés du site de clivage influent sur

l'hydrolyse du substrat, et favorise l'hypothèse que ces motifs distaux provoquent, par liaison à des exosites, la transconformation de l'enzyme d'une forme inactive vers une forme active (11). Pour cela, une étude de l'interaction de ces deux fragments S1 et S2 avec les exosites putatifs de l'enzyme a été effectuée.

Étude par résonance plasmonique de surface de la liaison de S1 et/ou S2 sur la chaîne légère de toxine tétanique

Une des méthodes de choix pour mesurer des interactions entre biomolécules est la résonance plasmonique de surface. Ainsi, le fragment peptidique S1 a été greffé par liaison peptidique sur les carboxyles libres de la matrice de dextran portés par le biocapteur. Alors que pris individuellement, ni le fragment S2, ni la chaîne légère de toxine tétanique se lient à S1, l'injection de toxine tétanique, préalablement incubée avec 10 équivalents de S2, provoque une forte augmentation de masse sur la surface du biocapteur, consécutive à la liaison du complexe S2/toxine tétanique à S1. Ce résultat montre que la chaîne légère de toxine tétanique est capable de se fixer sur S1 une fois qu'un complexe TeNT/S2 a été formé. Une autre conclusion est le caractère séquentiel de l'interaction entre la toxine et les fragments S1 et S2. En effet, S1 n'est capable de se lier qu'après la formation d'un complexe primaire S2/toxine alors que la réciproque n'est pas vraie.

Détermination de l'influence de S1 et S2 sur les constantes cinétiques de l'activité enzymatique de la chaîne légère de toxine tétanique

Nous avons cherché à déterminer l'influence des fragments S1 et S2 sur les constantes cinétiques de l'hydrolyse enzymatique par la toxine tétanique. Ainsi, lorsque

Hydrolyse de fragments de synaptobrevine par TeNT					Vitesse de clivage (p.moles.min ⁻¹ .μg ⁻¹)
32	LQQTQAQVDEVVIMRVNVDKVLERDQKSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNL			93	102 ± 5
27	S1	55	+	S 32-93	105 ± 5
			S 32-93	+ 82 S2 93 AKLRKYWWKNL	103 ± 5
50	VDKVLERDQKSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNL			93	1.5 ± 0.5
27	S1	55	+	S 50-93	52 ± 2
			S 50-93	+ 82 S2 93 AKLRKYWWKNL	1.5 ± 0.5
32	LQQTQAQVDEVVIMRVNVDKVLERDQKSELDDRADALQAGASQFETSA			81	< 0.1
			S 32-81	+ 82 S2 93 AKLRKYWWKNL	15 ± 0.5
27	S1	55	+	S 32-81	< 0.1
			56 RDQKSELDDRADALQAGASQFETSA	81	< 0.1
27	S1	55	+	S 56-81	< 0.1
			S 56-81	+ S2 AKLRKYWWKNL	< 0.1
27	S1	55	+	S 56-81	12 ± 0.5
				+ S2 AKLRKYWWKNL	

FIG. 3. — Influence de l'addition de S1 et/ou S2 sur le clivage enzymatique de différents peptides de synaptobrevine par la TeNT.

nous avons calculé les constantes cinétiques de l'hydrolyse du substrat Syb 39-88 [Pya88] par les méthodes classiques, nous avons constaté une déviation par rapport au modèle de Michaëlis-Menten, notamment lors de la représentation $1/V$ en fonction de $1/C$ de Lineweaver-Burk. Les points expérimentaux ne sont pas alignés comme dans une cinétique de type Michaëlienne mais ressemblent davantage au profil du modèle allostérique décrit par Monod, Wyman, Changeux en absence d'effecteur (12). En accord avec ce modèle, l'addition des effecteurs, en l'occurrence S1 et S2, provoque une diminution du K_m apparent du substrat Syb 39-88 [Pya88] qui retrouve une cinétique d'hydrolyse de type Michaëlien. L'effet est plus marqué après addition de S2, qui induit une diminution d'un facteur 10 du K_m (576 à 51 μM) que par ajout de S1 (K_m diminuant de 576 à 479 μM).

Proposition d'un modèle de type allostérique

Au vu de ces résultats, un modèle a pu être formulé pour rendre compte de l'activité enzymatique de la toxine tétanique vis-à-vis de la synaptobrevine (Fig. 4). La chaîne légère de TeNT adopte majoritairement en solution une conformation dépourvue d'activité protéolytique. La liaison de la séquence basique correspondant au fragment S2 avec un premier exosite de la toxine induit un déplacement de l'équilibre conformationnel vers une forme qui est maintenant capable de lier S1 *via* un second exosite nouvellement accessible. La liaison de S1 déplacerait alors l'équilibre conformationnel vers une nouvelle conformation présentant un site catalytique accessible et donc capable de lier le domaine clivable de la synaptobrevine dans un complexe de type Michaelis-Menten et de l'hydrolyser (11).

DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS SÉLECTIFS DE LA TOXINE TÉTANIQUE

Lorsque nous avons abordé la conception d'inhibiteurs spécifiques de la toxine tétanique, nos connaissances sur le mécanisme moléculaire de son activité enzymatique étaient plutôt limitées. Toutes les molécules connues comme étant des inhibiteurs puissants et sélectifs d'endopeptidases à zinc tels que le phosphoramidon pour la thermolysine, le captopril pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine et le thiorphan pour l'endopeptidase neutre 24.11 et bien d'autres (2), s'étaient révélés inefficaces vis-à-vis de l'activité enzymatique de la toxine tétanique même à des concentrations millimolaires. La structure cristalline des toxines clostridiales n'étant pas élucidée, la séquence (GASQ⁷⁶-F⁷⁷ETS) localisée de part et d'autre du site d'hydrolyse dans la toxine tétanique était donc la seule information disponible, concernant la spécificité de reconnaissance des différents sous-sites potentiellement présents dans le site actif de l'enzyme (Fig. 5). Des analogues pseudo-peptidiques de la synaptobrevine possédant un groupement thiol, soit en N- soit en C-terminal, afin de chélater l'atome de zinc ainsi qu'une séquence peptidique mimant celle de la synaptobrevine au niveau du site de clivage ont été synthétisés.

Lors des essais de ces premiers analogues (Gln-Ala-Ser-Gln-SH et HS-Phe-Glu-Thr-Ser-Ala) (une dizaine de toutes tailles), seule la glutamine-thiol 1 (Fig. 6) montra une IC_{50} de l'ordre de 250 μM .

Des relations structure-activité extrêmement précises sur le groupement chélatant le zinc, sur la nécessité ou non de l'amine libre et sur la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé ont pu être effectuées grâce à la synthèse

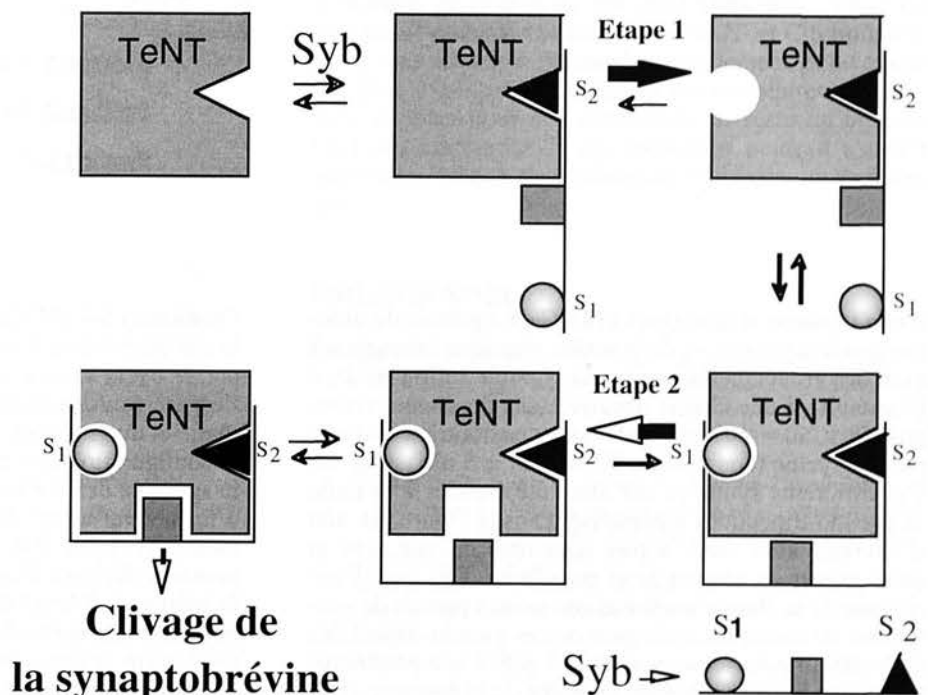


FIG. 4. – Modèle proposé d'allostérie. La liaison des 2 domaines S1 et S2 sur les exosites de la TeNT favorise son activité endopeptidase par des changements conformationnels (Syb = synaptobrevine, le triangle représente la séquence S2 de la synaptobrevine, le rond la séquence S1 et le carré hachuré la séquence de clivage).

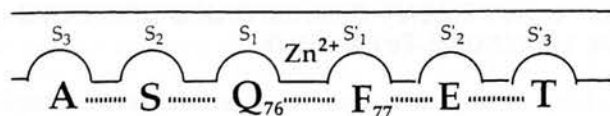


Fig. 5. – Séquence de synaptobrevine encadrant le site de clivage par la toxine tétanique.

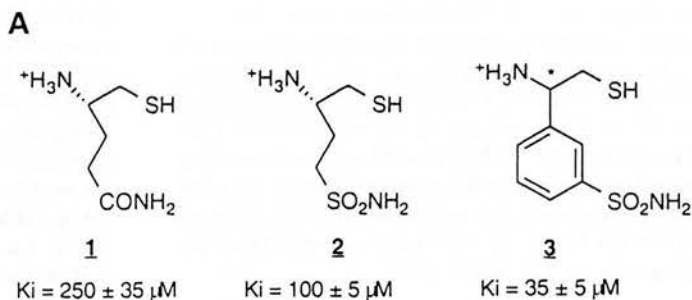
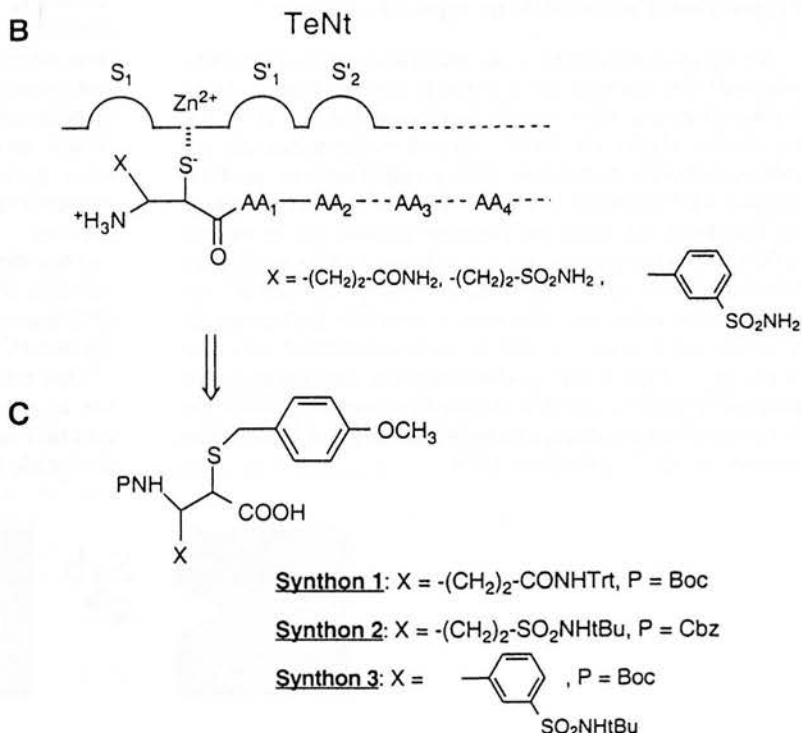


FIG. 6. – (A) Structure et pouvoir inhibiteur des composés 1, 2 et 3 de la série β -amino-thiols. Voie rétrosynthétique d'obtention des trois familles pseudo-peptidiques (B) à partir des *synthon 1*, *synthon 2* et *synthon 3* (C).



d'une trentaine d'analogues (12). Ceci a permis de montrer que le sous-site S1 de la toxine tétanique interagissait avec des groupements amides, si possible sulfonamide, à l'extrémité d'une chaîne linéaire à deux carbones (composé 2, $\text{IC}_{50} = 100 \pm 5 \mu\text{M}$) ou en position méta d'une phénylglycine (composé 3, $\text{IC}_{50} = 35 \pm 5 \mu\text{M}$) (Fig. 6). Ces différents synthons ont alors été étendus à la taille de pseudo-tripeptides schématisés dans la Figure 6B, afin d'interagir avec deux autres sous-sites du site actif et ainsi gagner en sélectivité et en affinité. Dès lors, l'utilisation de la chimie combinatoire nous a permis de synthétiser de multiples analogues de ces pseudo-tripeptides et de définir pour les sous-sites S'1 et S'2 une préférence respective pour les chaînes latérales de la tyrosine et de

l'histidine ($3\text{--}4 \mu\text{M}$ vis-à-vis de la toxine tétanique). Dans le cas du *synthon 3*, au vu de l'apport de rigidité imposé par le cycle aromatique quant au positionnement dans l'espace conformationnel du sulfonamide, de l'amine primaire et du groupement thiol, il était important d'étudier la configuration absolue du meilleur composé. Alors que la synthèse des *synthons 1* et *2* était réalisée par addition d'un nouvel agent de sulfénylation (le disulfure de 4-méthoxybenzyle 2,4-dinitrophényle) (13) sur les β -aminoesters dérivant d' α -aminoacide par homologation par la méthode d'Arndt-Eistert, la synthèse du *synthon 3* a nécessité une approche différente afin d'obtenir une voie totalement énantio- puis diastéréosélective (14). La voie synthétique est décrite dans la Figure 7.

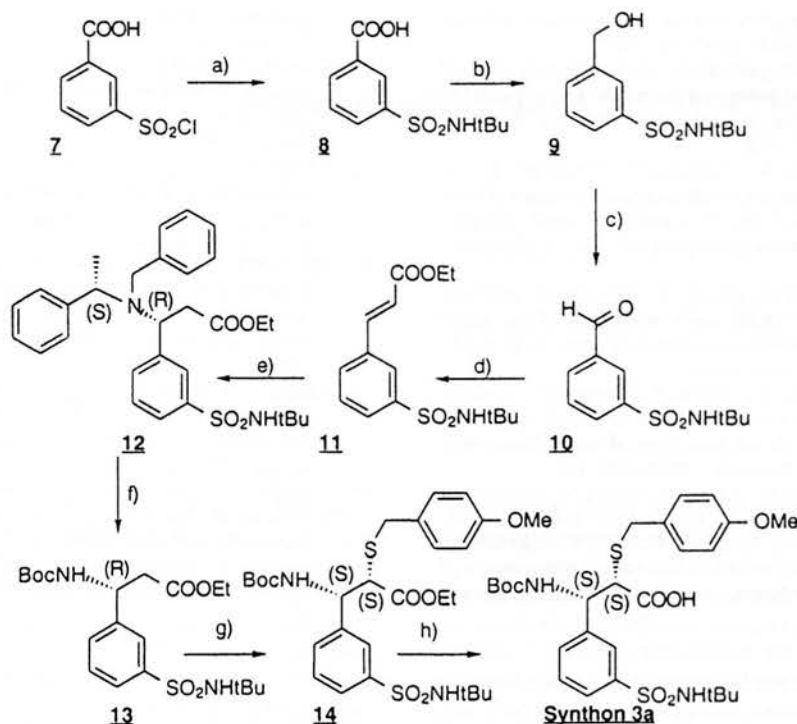
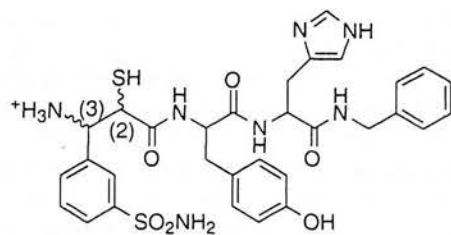


FIG. 7. – a) $t\text{BuNH}_2$; b) LiAlH_4 ; c) DMSO , $(\text{COCl})_2$, NEt_3 ; d) triéthylphosphonoacétate, NaH , DME , 50°C ; e) lithium (S) (a-méthylbenzyl)benzylamide, THF , -78°C ; f) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (1 éq), H_2 (10 atm), Boc_2O (3.7 éq), EtOAc , r. t., 24 h; g) LDA , disulfure de 4-méthoxybenzyle 2,4-dinitrophényle; h) BBTO , AcN , 82°C , 48 h.

Les 4 configurations correspondant aux meilleurs composés des pseudo-tripeptides ont été testées sur la TeNt et la BoNt/B et sont reportés dans le tableau suivant.



n°	(3)	(2)	Ki (TeNT)	Ki (BoNT/B)
(21 a)	(S)	(R)	$3.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$	$1.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$
(21 b)	(S)	(S)	$9.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$	$5.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$
(21 c)	(R)	(R)	$6.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$	$3.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$
(21 d)	(R)	(S)	$4.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$	$2.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$

Tous ces résultats montrent une faible spécificité de ces deux toxines vis-à-vis de la nature des résidus reconnaissant les sous-sites S'1 et S'2 d'une part, et l'absence d'effet de la configuration absolue des carbones 2 et 3 d'autre part. Par ailleurs, bien que ces inhibiteurs soient les plus puissants connus à ce jour, leur affinité reste encore modeste. Ces résultats sont inhabituels dans les métalloendopeptidases à zinc, telles que la NEP, l'ACE

où ce type d'inhibiteurs ont des pouvoirs inhibiteurs nanomolaires ou inférieurs (2). En fait le modèle allostérique du fonctionnement enzymatique de ces toxines suggère que les inhibiteurs rentrent en compétition avec le substrat au niveau du site actif alors que celui-ci est déjà lié à l'enzyme *via* des séquences N- et C-terminales. C'est une situation thermodynamiquement défavorable qui peut expliquer les affinités micromolaires déterminées *in vitro* pour ces inhibiteurs. Il reste qu'*in vivo*, l'activité inhibitrice de ces molécules pourrait s'avérer supérieure, ce que nous allons chercher désormais à étudier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Lauro P., Dasgupta B. & Montecucco C., Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 1992, 359, 832.
2. Roques B. P., Noble F., Daugé V., Fournié-Zaluski M. C. & Beaumont A., Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacological Rev.*, 1993, 45, 87.
3. Montecucco C., Papini E. & Schiavo G., Bacterial protein toxins and cell vesicle trafficking. *Experientia*, 1996, 52, 1026.
4. Schiavo G., Poulain B., Rossetto O., Benfenati F., Tauc L. & Montecucco C., Tetanus toxin is a zinc protein and its inhi-



- bition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J.*, 1992, 11, 3577.
5. Roques B. P., Zinc metallopeptidases: active site structure and design of selective and mixed inhibitors: new approaches in the search for analgesic and anti-hypertensives. *Biochem. Soc. Trans.*, 1993, 21, 678.
 6. Cornille F., Goudreau N., Ficheux D., Niemann H., & Roques B. P., Solid-phase synthesis, conformational analysis and *in vitro* cleavage of synthetic human synaptobrevin II 1-93 by tetanus toxin L chain. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 222, 173.
 7. Sathyamoorthy V. & DasGupta B. R., Separation, purification, partial characterization and comparison of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin types A, B and E. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 10461.
 8. Soleilhac J. M., Cornille F., Martin L., Lenoir C., Fournié-Zaluski M. C. & Roques B. P., A sensitive and rapid fluorescence-based assay for determination of tetanus toxin peptidase activity. *Anal. Biochem.*, 1996, 241, 120.
 9. Oppolzer W., Camphor as a natural source of chirality in asymmetric synthesis. *Pure & Appl. Chem.*, 1990, 62, 1241.
 10. Pellizzari R., Rossetto O., Lozzi L., Giovedi S., Johnson E., Shone C. C. & Montecucco C., Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 20353.
 11. Cornille F., Martin L., Lenoir C., Cussac D., Roques B. P. & Fournié-Zaluski M. C., Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 3459.
 12. Martin L., Cornille F., Coric P., Roques B.P. & Fournié-Zaluski M. C., β -aminothiols inhibit the Zn-metallopeptidase activity of tetanus toxin light chain. *J. Med. Chem.*, 1998, 41 (18), 3450-3460.
 13. Bischoff L., David C., Martin L., Meudal H., Roques B. P. & Fournié-Zaluski M. C., 2,4-dinitrophenyl, 4-methoxybenzyl disulfide: a new, versatile and efficient reagent for the electrophilic sulfenylation of β -aminoester enolates. *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 4848.
 14. Martin L., Cornille F., Turcaud S., Meudal H., Roques B.P. & Fournié-Zaluski M. C., Metallopeptidase inhibitors of tetanus toxin: a combinatorial approach. *J. Med. Chem.*, 1999, 42 (3), 515-525.
 15. Cornille F., Deloye F., Fournié-Zaluski M. C., Roques B. P. & Poulain B., Inhibition of neurotransmitter release by synthetic proline-rich peptides shows that the N-terminal domain of VAMP/synaptobrevin is critical for neuro-exocytosis. *J. Med. Chem.*, 1995, 270, 16826.