L'Act. Chim. (R) 1997, 1, 4-12

La chimie bioorganométallique en réceptorologie et analyse

II - Les marqueurs métaux carbonyles en analyse

Gérard Jaouen* *professeur,* **Anne Vessières*** *directeur de recherche,* **Siden Top*** *directeur de recherche CNRS,* **Michèle Salmain*** *chargée de recherche CNRS*

Summary : ***Bioorganometallic chemistry : a burgeoning area. Examples in receptorology and analysis. The metal carbonyl tracers in analysis.***

*Bioorganometallic chemistry appears as a new pluridisciplinary domain of research. It is based on the combination of biological species (bioligands) with organometallic compounds, such an association taking advantage of the particular physical and chemical properties of the latter species. In the second part of this review**, we present its contribution to analytical biochemistry. Metal carbonyls' spectral features in the mid-IR region open the way to a new family of analytical probes with applications in the area of mono- and multi-immunoassays. An example in the antiepileptic drug series is described. Eventually, several tracks concerning the organometallic chemistry of proteins, an area still at an embryonic state, are discussed.*

Mots clés : ***Bioorganométallique, infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF), dosages immunologiques, multi-immunodosages, protéines.***

Key-words : *Bioorganometallic, Fourier transform infrared (FT-IR), immunoassay, multi-immunoassay, proteins.*

Modification des stéroïdes pour l'analyse par IR-TF

Synthèse des complexes

Pour un chimiste spécialiste des complexes métaux carbonyles, la position la plus évidente pour marquer une molécule d'œstradiol est la complexation directe du cycle aromatique A, ligand à 6 électrons, par une entité telle que $Cr(CO)_3$.

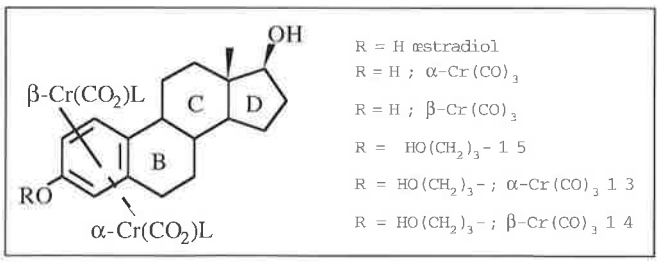


Schéma 18.

Par chauffage à reflux d'œstradiol (E_2) en présence de $Cr(CO)_6$, on obtient deux diastéréoisomères selon que le trépied $Cr(CO)_3$ se trouve complexé sur la face α ou β du stéroïde. Les deux diastéréoisomères ainsi obtenus peuvent être séparés par chromatographie sur gel de silice et caractérisés. En raison de la présence du groupe phénolique, ces complexes se décomposent rapidement en solution alcoolique ce qui les rend inutilisables pour des études biochimiques. Les fonctions 3-OH et 17-OH étant essentielles pour la reconnaissance de l'œstradiol par son récepteur spécifique (RE), nous avons choisi d'éloigner la fonction 3-OH par addition d'une chaîne $HO-(CH_2)_3$ qui, par effet de repliement, permet au OH de retrouver une position très proche de celle du 3-OH dans l'œstradiol. On prépare ainsi le dérivé **15** qui par complexation conduit aux deux diastéréomères **13** et **14** (*schéma 18*).

La détermination de la structure des diastéréoisomères a été élucidée grâce à la structure rayons X du complexe **16** dont l'ORTEP est représenté sur le *schéma 19*. On y voit clairement que le trépied métal carbonyle $Cr(CO)_2CS$ se trouve sur la face α de la molécule, c'est-à-dire la face opposée à la face β qui contient le C (18).

Ces complexes sont stables en solution alcoolique plusieurs semaines à la seule condition d'être conservés au froid et à l'abri de la lumière solaire. Ils peuvent donc être utilisés pour des études biochimiques. Comme nous l'avons

* École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05. Tél. : 01.43.26.95.55. Fax : 01.43.26.00.61.
E-mail : jaouen@ext.jussieu.fr

** Partie I : Étude du récepteur des œstrogènes, *L'Actualité Chimique*, octobre-novembre 1996, p. 9-15.

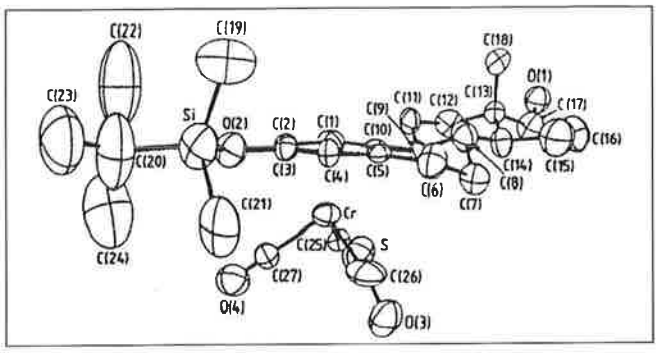


Schéma 19 - Vue ORTEP du complexe 16 avec l'entité $Cr(Co)_2CS$ attachée sur la face α du stéroïde.

déjà signalé, le premier point à étudier est de savoir si ces complexes sont toujours reconnus par le récepteur de l'œstradiol, c'est pourquoi l'on détermine en premier lieu leur valeur d'affinité relative de liaison (ARL) pour le récepteur de l'œstradiol (RE)

Il est intéressant de noter (*tableau IV*) que les hormones complexées sont encore reconnues par le RE, cependant les valeurs d'ARL des complexes α et β sont très différentes. En effet, alors que le complexe α **13** a une valeur d'ARL de 28 % très proche de celle du dérivé non complexé **15** (ARL = 38 %), le complexe β **14** voit sa valeur d'ARL chuter de façon spectaculaire (ARL = 1,8 %). Ce résultat indique que la face β du stéroïde sur laquelle se trouve le 17-OH et le 18-CH_3 ne tolère pas d'encombrement alors que la face α s'en accommode plutôt bien. A notre connaissance, l'addition d'un greffon métal carbonyle est le seul moyen permettant de faire la discrimination entre les faces α et β du cycle A de l'œstradiol [30].

Tableau IV - Les dérivés œstradiol-chrome et leurs valeurs d'affinité relative de liaison (ARL) pour le récepteur de l'œstradiol.

Produit	R	$Cr(CO)_2L$	ARL (%)
1	H	-	100
15	$HO(CH_2)_3$	-	37
13	$HO(CH_2)_3$	α-$Cr(CO)_3$	28
14	$HO(CH_2)_3$	β-$Cr(CO)_3$	1,8
16	$Si(CH_3)_2tBu$	α-$Cr(CO)_2CS$	1,5

Des fractions de cytosol d'utérus de brebis contenant le RE sont incubées en présence d'une quantité fixe de [^{3}H]-E_2 et de quantités croissantes d'E_2 froid ou d'un des stéroïdes à tester. On détermine pour chaque produit la concentration d'hormone nécessaire au déplacement de 50 % de la liaison de [^{3}H]-E_2 à son récepteur. La valeur d'ARL est le rapport (x 100) de la valeur de la concentration trouvée pour l'E_2 froid sur la concentration trouvée pour le produit testé. Par définition, la valeur trouvée pour l'E_2 est donc égale à 100.

Synthèse d'hormone organométallique radioactive

Afin d'étudier de façon plus approfondie l'interaction de ce complexe **13** avec le récepteur de l'œstradiol, nous l'avons synthétisé sous forme radioactive par réduction de la cétone complexée correspondante par du NaB[^{3}H]$_4$ (*schéma 20*) [31].

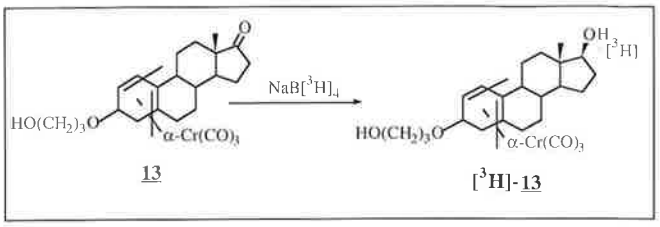


Schéma 20 - L'hormone ainsi préparée a une activité spécifique de 4,3 Ci/mmole qui lui permet d'être utilisée pour des études biochimiques.

Études des interactions [^{3}H]-13-récepteur de l'œstradiol

Pour cette étude, on incube de quantités croissantes [^{3}H]-**13** (comprises entre 0,5 et 25 nM) en présence d'une quantité fixe de RE contenus dans un cytosol d'utérus de brebis préparé comme indiqué dans la référence [30]. A la fin de la période d'incubation, on mesure la quantité d'hormone liée au RE et l'on obtient la courbe représentée sur le *schéma 21A*.

On peut souligner les trois points suivants : (1) la liaison de [^{3}H]-**13** au RE est saturable (on atteint un maximum de liaison pour une molarité d'incubation d'environ 10 nM), (2) cette liaison est réversible (elle est déplacée par un excès d'hormone non radioactive), (3) le taux de liaison non spécifique, c'est-à dire celui qui correspond à une liaison de l'hormone radioactive non déplaçable par un excès d'hormone froide, est faible. Nous avons également montré que la liaison de [^{3}H-**13**] au RE est spécifique des œstrogènes, c'est-à-dire qu'elle n'est déplacée que par les dérivés œstrogéniques (œstradiol et le diéthylstilbestrol) mais pas par les autres hormones stéroïdes (progestérone, testostérone, dihydrotestostérone). De plus, la valeur de la constante d'affinité déterminée à l'aide de la droite de Scatchard (*schéma 21B*) pour [^{3}H]-**13**, K_D = 0,85 nM, est très proche de celle trouvée pour E_2 lui-même (K_D = 0,67 nM). Nous avons donc à notre disposition une hormone organométallique dont le comportement vis-à-vis des récepteurs est proche de celui de l'œstradiol.

Utilisation des hormones organométalliques pour la détection par infrarouge à transformée de Fourier (IR-FT) des récepteurs de l'œstradiol

Il est bien connu depuis les travaux de Cotton, dans les années 60, que les métaux carbonyles possèdent en infrarouge des vibrations ν(CO) caractéristiques dans la région 1850 - 2200 cm^{-1}. Comme le montre le spectre du *schéma 22A*,le complexe **13** possède dans cette région deux bandes à 1960 cm^{-1} (a_1) et 1876 cm^{-1} (e) caractéristiques de la symétrie C_{3v} du complexe. L'intérêt de ces bandes est qu'elles sont très intenses, 3 à 5 fois plus intenses que toutes les autres bandes du spectre et qu'elles apparaissent dans une région dans laquelle les protéines n'absorbent pas. On voit

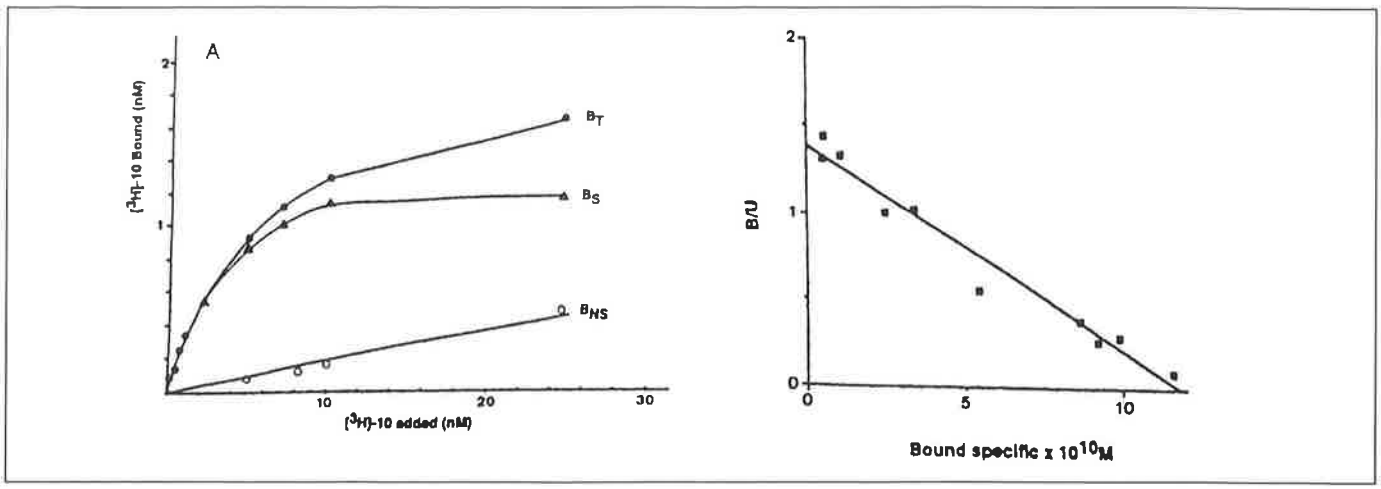


*Schéma 21 a et b - Interaction de [^{3}H]-**13** avec les RE contenus dans un cytosol d'utérus de brebis.*
A : Des fractions de cytosol d'utérus de brebis (1,5 mg/mL) sont incubées à 4 °C pendant 3 h en présence des concentrations croissantes de [3H]-13 seul ou en présence d'un excès (100 fois) d'œstrogène (DES) non radioactif qui permet de déterminer le taux de liaison non spécifique (BNS). Les taux de liaisons totales (BT) et non spécifique (BNS) sont mesurées par précipitation des protéines acides (dont le RE) au sulfate de protamine [3]. On en déduit le taux de liaison spécifique BS = BT-BNS.
*B : Représentation selon Scatchard de la quantité de [^{3}H]-**13** liée (bound specific) en fonction du rapport [^{3}H]-**13** liée/[^{3}H]-**13** libre (B/U).*

en effet, sur le spectre du *schéma 22B* qui est celui de protéines de cytosol d'utérus de brebis précipitées, qu'il existe une fenêtre spectrale dans cette région. Après incubation de ces protéines qui, rappelons-le, contiennent les RE, en présence de **5** puis précipitation, on obtient le spectre du *schéma 22C* sur lequel on voit apparaître deux petits pics entre 1850-2200 cm^{-1}. Après expansion de cette région, on obtient le *schéma 22D$_1$* sur lequel on peut identifier les pics caractéristiques du complexe **13** à 1960 et 1876 cm^{-1}. Ces pics disparaissent lorque le cytosol est incubé en présence de **13** et d'un excès d'œstrogènes (DES ; *schéma 22D$_2$*). Ce qui confirme que cette liaison **13** - RE est réversible. Nous avons donc montré qu'il est possible d'utiliser les hormones organométalliques couplées à une détection par IR-TF pour effectuer une détection non isotopique des RE. Il s'agit d'une grande première pour la spectroscopie infrarouge qui reste une technique très peu utilisée dans le domaine biomédical. Il faut cependant noter que le choix de l'étude des récepteurs des hormones stéroïdes pour démontrer la faisabilité de notre approche plaçait la barre excessivement haut pour ce qui concerne la sensibilité de la détection des traceurs : en effet, la quantité de RE présent dans un cytosol d'utérus de brebis est de seulement quelques dizaines de femtomoles par mg de protéines (1 fmol = 10^{-15}M) ce qui explique que les pics correspondants à l'hormone complexée soient aussi peu intenses et il est clair que, en l'absence d'une amélioration significative de la sensibilité, l'étude quantitative des récepteurs est hors de portée de la technique. Par contre, les sensibilités requises pour les dosages immunologiques sont nettement moins élevées surtout lorsqu'on s'intéresse au dosage de substances exogènes telles que les médicaments ou les drogues ; c'est pourquoi, nous avons recentré ce travail sur la mise au point d'un immunodosage inédit que nous avons baptisé Carbonyl Metallo Immuno Assay (CMIA).

Utilisation des complexes métaux carbonyles comme traceurs du dosage immunologique non isotopique CMIA

Étude quantitative des complexes métaux carbonyles par IR-TF

Jusqu'à un passé récent, la spectroscopie infrarouge souffrait de deux handicaps qui la rendait inutilisable en analyse clinique. Tout d'abord, l'IR n'était pas considéré comme une technique utilisable pour des études quantitatives [32] et, d'autre part, la sensibilité atteinte avec les spectromètres dispersifs était incompatible avec celle requise pour les analyses biologiques et qui se situe, au minimum, dans la gamme des picomoles (10^{-12} M). L'apparition, dans les années 80, d'appareils IR-TF de paillasse de conception totalement nouvelle, d'un prix abordable et faciles à utiliser pour un non-spectroscopiste a radicalement modifié les données du problème. En effet, ces appareils autorisent pour la première fois, des études quantitatives infrarouge dans une zone de sensibilité compatible avec celle requise en chimie clinique [33]. La conception première des appareils IR-TF n'étant pas axée sur les contraintes spécifiques de l'analyse clinique qui sont l'étude avec un maximum de sensibilité de fluides biologiques (sang par exemple) accessibles en petites quantités, nous avons tout d'abord cherché à optimiser la sensibilité des appareils existant en étudiant les paramètres suivants : les conditions de l'analyse par IR-TF et la nature du greffon organométallique.

Optimisation des conditions d'analyse par IR-TF (détecteur et cellule)

Nous avons choisi de travailler sur un appareil IR-TF de paillasse et, pour améliorer la sensibilité de cette appareil-

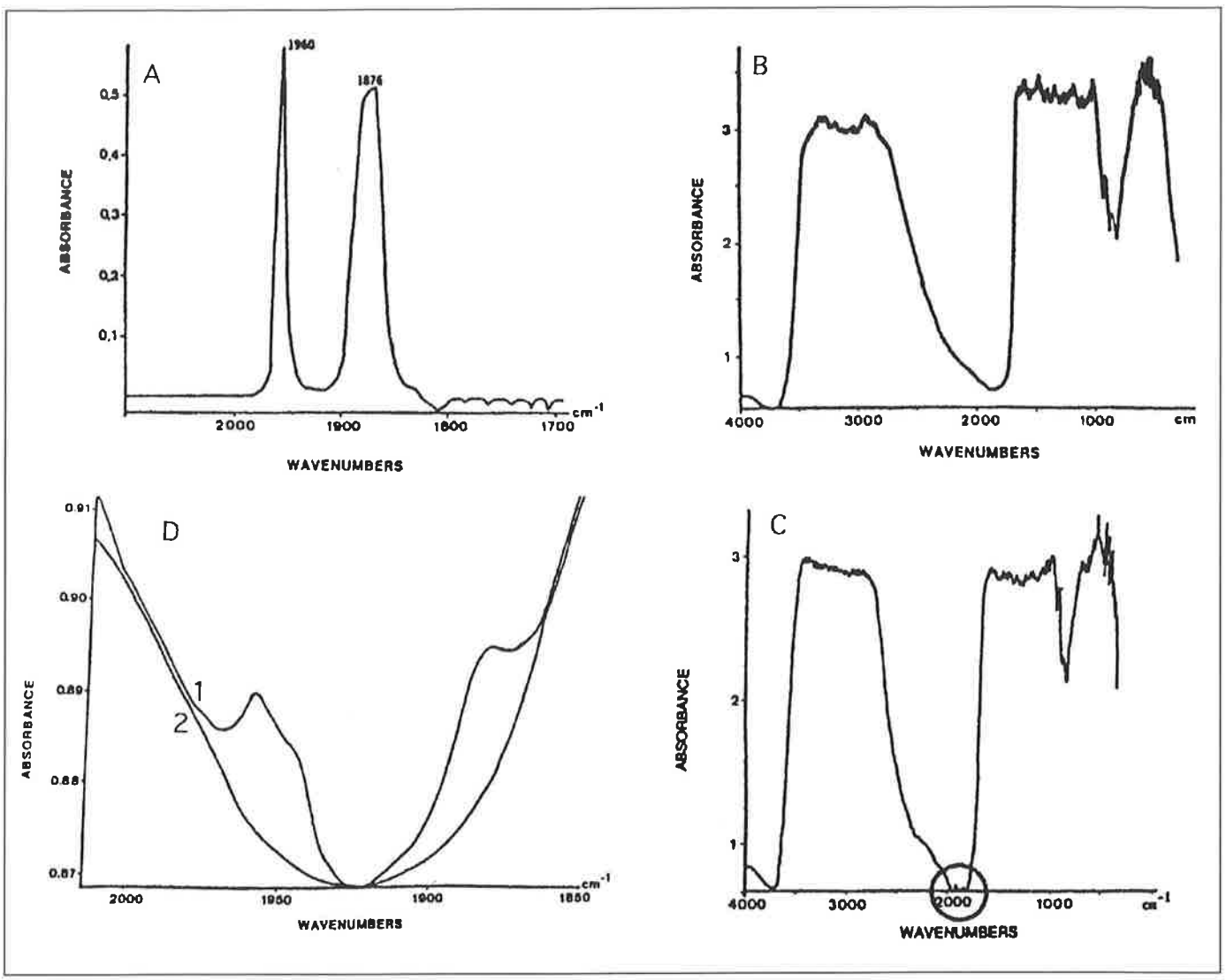


Schéma 22 *- Spectres infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) de* ***13*** *et de protéines d'utérus de brebis précipitées en présence ou en absence de 13 (expansion de la région 1850-2200 cm^{-1}).*
Schéma 22A *- Spectre de* ***13*** *en solution dans le benzène.*
Schéma 22B *- Spectre IR-TF d'un cytosol d'utérus de brebis précipité au sulfate de protamine.*
Schéma 22C *- Spectre d'un cytosol d'utérus de brebis incubé en présence de* ***5*** *et précipité au sulfate de protamine.*
Schéma 22D *- Spectre d'un cytosol d'utérus de brebis incubé en présence de* ***13 (D1)*** *ou en présence de* ***13*** *+ un excès de l'hormone œstrogène DES* ***(D2)****.*

lage, on peut jouer sur deux paramètres : la nature du détecteur et sur la cellule d'analyse.

En ce qui concerne le détecteur, il est indispensable de travailler avec un détecteur constitué d'un matériau semi-conducteur refroidi à l'azote liquide dont la sensibilité est beaucoup plus grande que celle d'un détecteur thermique (DTGS, par exemple). Pour l'étude des bandes $\nu_{(CO)}$ des greffons métaux carbonyles, le meilleur choix nous semble être un détecteur InSb puisque sa sensibilité est maximale dans la région des 2000 cm^{-1} qui nous intéresse. Un autre choix possible est un détecteur MCT à condition de le sélectionner sur des critères de sensibilité.

Le choix de la cellule de mesure est également un maillon essentiel pour l'amélioration de la sensibilité. En effet, lorsque l'on travaille en solution, la valeur d'absorbance obéit à la loi de Beer-Lambert ($A = \varepsilon \times l \times c$), elle est donc directement proportionnelle à la longueur du trajet optique. Dans notre cas, il est donc nécessaire de disposer d'une cellule ayant un faible volume (quelques dizaines de microlitres) et de long trajet optique. Il n'existait pas sur le marché de cellule de ce type, c'est pourquoi nous avons adapté le principe des cellules de type « light pipe » (utilisées dans le couplage chromatographie gazeuse/IR-TF) à nos exigences en faisant construire une cellule constituée d'un tube d'or enchassé dans une pièce d'acier et percé d'un trou de1 mm de diamètre qui constitue l'intérieur de la cellule. Cette cellule a un volume interne de 23 µl pour un trajet optique de 20 mm [34]. C'est elle qui nous a permis d'obtenir les analyses les plus sensibles [33].

Choix des entités métaux carbonyles utilisables comme traceurs en IR-TF

Différentes entités métal carbonyles peuvent être fixés sur des molécules organiques ayant un intérêt potentiel en analyse clinique. Il s'agit, par exemple, des entités $\eta^5(C_5H_5)Mn(CO)_3$, $\eta^6(C_6H_6)Cr(CO)_3$, $-C{\equiv}C-CH_3/Co_2(CO)_6$, $-C{\equiv}C-CH_3/-Mo_2Cp_2(CO)_4$ que nous avons greffées sur des dérivés d'hormones stéroïdes et de médicaments (*schéma 23*).

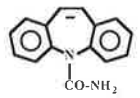
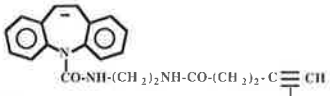
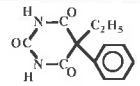
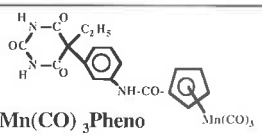
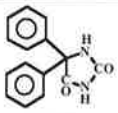
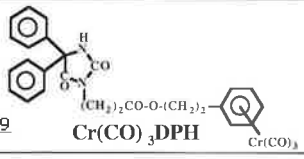
Médicament antiépileptique	Traceur organométallique
 carbamazepine	 17 $Co_2(CO)_6$carba
 phenobarbital	 18 $Mn(CO)_3$Pheno
 DPH	 19 $Cr(CO)_3$DPH

Schéma 23 - Les traceurs organométalliques des médicaments.

Nous avons déterminé pour chacun d'eux les quantités minimales détectables. Pour chaque complexe, la meilleure sensibilité est toujours obtenue pour la bande la plus fine et la plus intense, et c'est le complexe **17** porteur de l'entité acétylène dicobalt hexacarbonyle qui permet d'atteindre la plus grande sensibilté. Il est intéressant de noter que les limites de détection ne sont pas proportionnelles au maximum d'absorbance, par exemple la limite de détection du complexe du chrome **19** est 10 fois plus élevée que celle du cobalt alors que les intensités maximales des bandes sont les mêmes. Ceci peut s'expliquer par le positionnement de ces bandes par rapport aux bandes de vibration-rotation de la vapeur d'eau qui perturbent la bande à 1961 cm^{-1} du complexe du chrome carbonyle. La meilleure sensibilité est donc obtenue avec le complexe du cobalt hexacarbonyle. Lorsque celui est étudié avec la cellule « light pipe » spécialement construite pour notre application, la limite de détection est de 300 fmoles (3×10^{-13}M). Il s'agit, à notre connaissance, de la meilleure sensibilité jamais obtenue en solution. Nous avons également montré que, pour ce complexe, la loi de Beer-Lambert est vérifiée dans la gamme 0,3- 300 pmoles, ce qui les rend utilisables en biologie clinique.

On sait, d'autre part, que les bandes ν(CO) des entités métal carbonyles, que nous venons de décrire, sont peu influencées par l'entité organique sur laquelle elles sont fixées ; les résultats obtenus nous ont donc permis d'orienter les choix des traceurs des médicaments antiépileptiques auxquels nous nous sommes intéressés.

Mise au point du mono-immunodosage CMIA

Nous nous sommes intéressés au dosage immunologique des médicaments et plus particulièrement au dosage des médicaments antiépileptiques suivants : phénobarbital, diphénylhydantoine (DPH), carbamazépine. Ce choix est motivé par les raisons suivantes (1) les concentrations sanguines de ces médicaments se situent dans une gamme de sensibilité compatible avec celle de l'analyse IR-TF en solution telle que nous l'avons mise au point, (2) les doses efficaces et toxiques de ces médicaments sont proches et, comme leur métabolisme varie beaucoup d'un individu à l'autre, leur dosage est effectué à grande échelle en milieu hospitalier, (3) il s'agit de substances fréquemment administrées simultanément, elles apparaissent donc comme un exemple de choix pour les multi-immunodosages qui constituent le but ultime de ce travail. Un immunodosage fait appel aux trois protagonistes suivants représentés sur le *schéma 24 :* (1) l'analyte qui est la substance à doser, (2) des anticorps spécifiques de cette substance, (3) un traceur qui est une molécule d'analyte sur laquelle on a greffé une sonde détectable en très faible quantité.

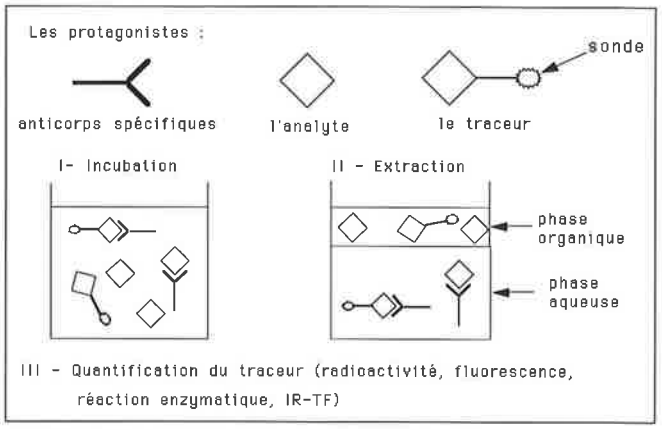


Schéma 24 - Principes d'un immunodosage.

Les premiers immunodosages ont été mis au point dans les années 60 avec des traceurs radioactifs, comme par exemple les traceurs marqués à l'iode-125 ou ^{131}I, le ^{3}H, qui sont encore utilisés aujourd'hui car ils permettent des dosages extrêmement fiables et sensibles. Par contre, l'utilisation de ces traceurs posent des problèmes d'exposition aux radiations et de traitement des déchets. Leur utilisation est maintenant très réglementée et limitée à quelques centres spécialisés. On a donc assisté, depuis le début des années 70, à l'apparition et au développement de méhodes non isotopiques qui utilisent des traceurs non radioactifs dont les plus répandus sont les traceurs enzymatiques et les traceurs fluorescents. Cependant, il n'existe pas encore à l'heure actuelle de traceur idéal, c'est pourquoi nous avons cherché à explorer le potentiel offert dans ce domaine par les complexes métaux carbonyles. L'immunodosage mis au point au laboratoire est un immunodosage de type compétitif qui est réalisé en trois étapes : (I) l'étape d'incubation au cours de laquelle une quantité fixe de traceur et une quantité d'anticorps en défaut sont mises à incuber en présence de l'analyte à doser, (II) l'étape de séparation des fractions libres et liées de traceur. Dans notre cas, cette séparation est une extraction par un solvant organique (l'éther isopropylique, par exemple) de la fraction libre du traceur, (III) quantification du traceur par une méthode adaptée au traceur. Il peut s'agir d'une mesure de radioactivité ou d'activité enzymatique, de fluorescence où, dans notre cas, de spectroscopie infrarouge. La première étape à franchir est la préparation de traceurs métaux carbonyles spécifiques de chaque substance à doser. En ce qui concerne les trois médicaments antiépileptiques que nous souhaitons étudier, nous avons retenu les trois complexes métaux carbonyles représentés sur le *schéma 23* puisque nous avons montré que l'on savait les doser de

façon quantitative dans la gamme des picomoles qui est celle utilisée pour le dosage des médicaments. Il nous faut également disposer d'anticorps spécifiques des trois substances que l'on cherche à doser. Il s'agit de petites molécules dépourvues de propriétés immunogéniques (leur injection à un animal n'entraîne pas la production d'anticorps spécifiques, car ces substances ne sont pas reconnues comme des corps étrangers par l'animal auquel on les injecte). Pour obtenir des anticorps il faut donc, dans un premier temps, préparer un immunogène en couplant l'analyte que l'on cherche à doser avec une protéine, la Bovine Serum Albumine (BSA) par exemple. Pour préparer un immunogène, on commence par fixer sur la molécule un bras porteur d'une fonction réactive. On utilise ensuite un agent de couplage pour le fixer sur les résidus libres NH_2 ou COOH de la protéine. Le nombre de résidus fixés sur la BSA varient en fonction des conditions expérimentales utilisées. Si ce nombre est trop élevé, on obtient un produit insoluble qui ne peut être injecté mais, si ce nombre est trop faible, la quantité d'anticorps obtenue l'est généralement aussi. Les immunogènes nous ayant servi à obtenir les anticorps spécifiques des médicaments antiépileptiques sont représentés sur le *schéma 25*.

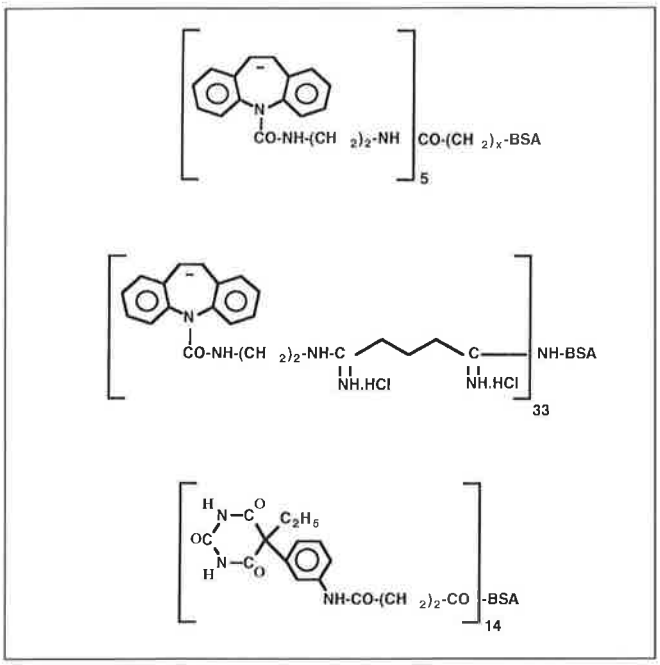


Schéma 25 *- Les immunogènes de la carbamazépine et de la DPH.*

Après injection à des lapins sous forme de primo-injection puis de rappels mensuels pendant au moins six mois, ils nous ont permis d'obtenir des anticorps spécifiques des trois substances que l'on cherche à doser. Pour suivre l'apparition des anticorps spécifiques dans le sérum de lapin, on réalise une courbe de titration par notre technique CMIA. Une courbe de ce type est représentée sur le *schéma 26*. Elle est obtenue en incubant des fractions contenant une quantité fixe de traceur métal carbonyle (ici 30 pmoles) en présence de dilutions croissantes du sérum à tester et l'on mesure pour chaque fraction la quantité de traceur fixée. Dans le cas d'un dosage CMIA, chaque point de la courbe correspond à un spectre infrarouge qui permet de quantifier le traceur présent dans chaque fraction. La valeur du titre est par définition l'inverse de la dilution qui fixe 50 % de la quantité de traceur. Dans le cas représenté sur le *schéma 26*, la valeur du titre est de 800. Cette valeur du titre reflète la quantité d'anticorps présent dans le sérum mais ne donne pas d'indications sur la faculté de ces anticorps à reconnaître la substance que l'on cherche à doser.

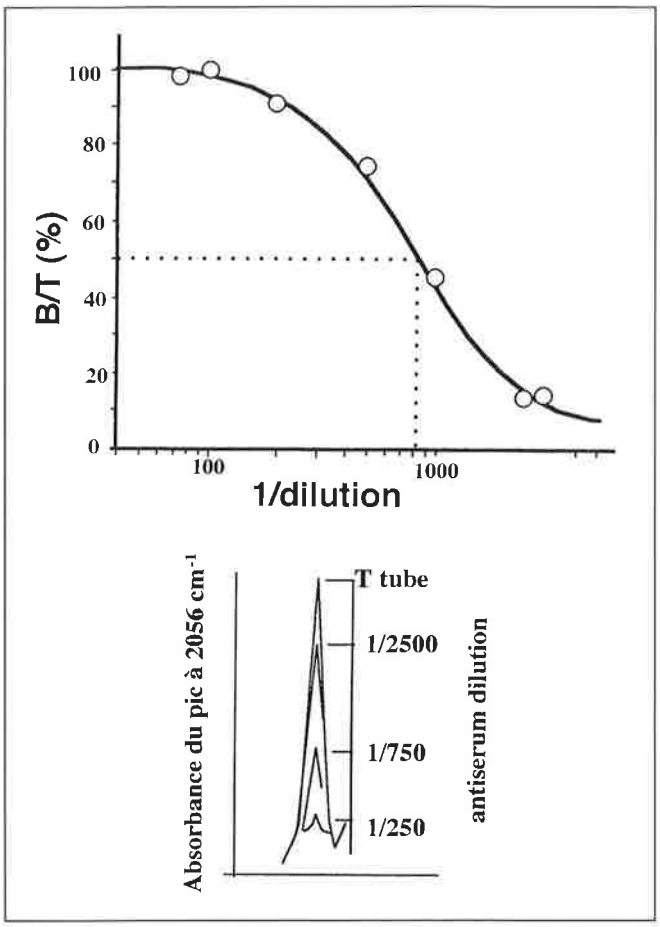


Schéma 26 *- Courbe de titration des anticorps anti-carba par CMIA.*

Ces résultats sont fournis par la courbe standard qui est représentée sur le *schéma 27*. Cette courbe est obtenue en incubant des fractions contenant des quantités fixes de traceur et d'anticorps (égale à la valeur du titre) et des quantités croissantes de la substance que l'on cherche à doser (ici la carbamazépine). On mesure ensuite pour chaque fraction le pourcentage de traceur lié représenté par B sur la valeur Bo qui correspond à la quantité de traceur lié en l'absence de carbamazépine. On obtient donc des valeurs comprises entre 100 % et 0 %. Lorsque la quantité de substance à doser augmente, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue donc également la valeur de B/Bo.

Une courbe telle que celle représentée sur le *schéma 27* avec une valeur de B/Bo qui tend vers zéro pour des valeurs de substance à doser élevées, indique que les anticorps utilisés ont une bonne spécificité et permettront de réaliser un dosage immunologique sensible. Lorsque l'on analyse un échantillon inconnu, on détermine une valeur de B/Bo à partir de laquelle on déduit la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. Dans le cas d'un échantillon sanguin contenant de la carbamazépine, il faut seulement quelques micro-

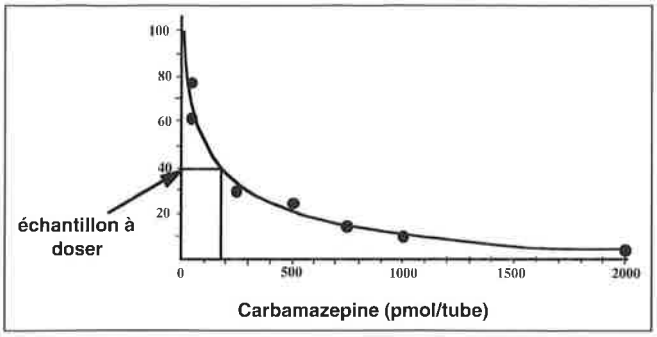


Schéma 27 - Courbe standard CMIA de la carbamazépine.

litres de sérum pour réaliser ce dosage. L'allure de cette courbe standard obtenue par CMIA est totalement identique à celle obtenue pour les autres méthodes, ce qui démontre la faisabilité du dosage CMIA de la carbamazépine [35]. La mise au point du dosage mono-CMIA a également été réalisée pour deux autre médicaments le phénobarbital [36] et la diphényl hydantoïne [37], mais aussi pour le cortisol [38] une substance endogène qui est présente dans le sang à des doses environ 1 000 fois plus faibles que les médicaments. Les avantages spécifiques de la méthode CMIA par rapport aux autres techniques nous semblent être les suivants : l'absence de signal non spécifique qui est un avantage important par rapport à une technique comme la fluorescence. En effet, les métaux carbonyles sont des substances artificielles qui n'existent pas dans la nature et les signaux intenses observés en infrarouge autour de 2 000 cm^{-1} ne peuvent que leur correspondre. Un autre point fort est qu'il est possible de synthétiser un traceur pour n'importe quelle molécule, il suffit pour cela de s'inspirer des synthèses mises au point pour la préparation des immunogènes et enfin, point le plus important, chaque sonde possède des bandes caractéristiques ce qui permet d'envisager l'analyse simultanée de plusieurs substances et permet d'aborder le multidosage CMIA.

Mise au point d'un multi-dosage CMIA

L'idée des multi-immunodosages est apparue très tôt dans la littérature car elle correspond à des besoins bien définis comme, par exemple, les bilans thyroïdiens, la recherche d'allergènes, le suivi de malades polymédicamentés et la toxicologie d'urgence. Cependant, à ce jour, seules quelques solutions ponctuelles ont été publiées. La pierre d'achoppement de leur mise au point est la difficulté d'accès à des combinaisons de traceurs émettant des signaux analysables simultanément. Il existe dans la littérature quelques combinaisons de deux marqueurs telles que des traceurs radioactifs [^{125}I et ^{131}I] [39] ou [^{125}I et ^{57}Co] [40], des marqueurs fluorescents [europium et terbium ou europium et samarium] [41] ou des enzymes [β-galactosidase et phosphodiestérase] ou [β-galactosidase et alkaline phosphatase] [42], mais la seule voie décrite comme prometteuse dans le domaine est celle offerte par les lanthanides fluorescents qui devraient, à terme, permettre l'analyse d'un mélange de quatre traceurs [43]. Très récemment, plusieurs auteurs ont noté qu'il s'agissait là d'un des défis majeurs dans le domaine des immunodosages [44] et nous avons cherché à étudier les potentialités offertes dans le domaine par les traceurs métaux carbonyles. Le problème essentiel à résoudre est celui de l'analyse simultanée des traceurs. Si on s'intéresse tout d'abord au cas du mélange de deux traceurs, les trois cas de figure possibles sont représentés sur le *schéma 28*.

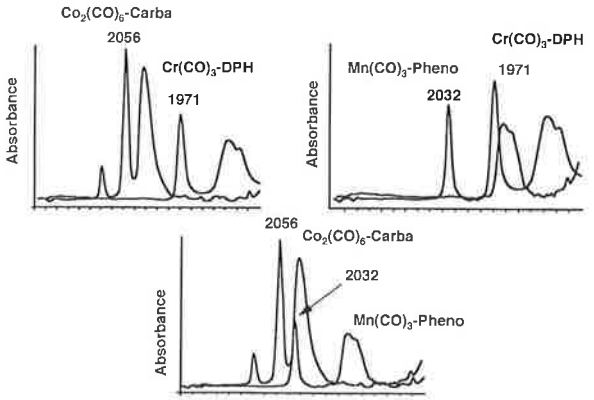


Schéma 28 - Superposition des spectres IR-TF correspondant aux trois mélanges de deux traceurs.

Le cas le plus simple est celui du mélange des complexes $Co_2(CO)_6$-Carba et $Cr(CO)_3$-DPH ; en effet, dans ce cas, il n'y a aucun recouvrement des pics des deux traceurs et une simple mesure des valeurs d'absorbance des pics à 2 056 et 1 971 cm^{-1} permet de quantifier chacun des traceurs. Les deux autres cas sont un peu plus compliqués car nous avons recouvrement partiel (cas du mélange $Mn(CO)_3$-Phéno + $Cr(CO)_3$-DPH) ou total (cas du mélange $Co_2(CO)_6$-Carba + $Mn(CO)_3$-Phéno) d'un des pics servant à l'analyse quantitative du traceur. La quantification des produits se fait alors grâce à un calcul en cascade ou en utilisant un calcul matriciel [45]. Nous avons ainsi montré que l'analyse des deux composantes du mélange se fait avec une erreur qui ne dépasse pas 5 %. Nous avons ainsi pu aborder le problème du double dosage CMIA et montrer que les courbes standard obtenues en mono et double CMIA sont superposables (*schéma 29*) ce qui en montre la faisabilité.

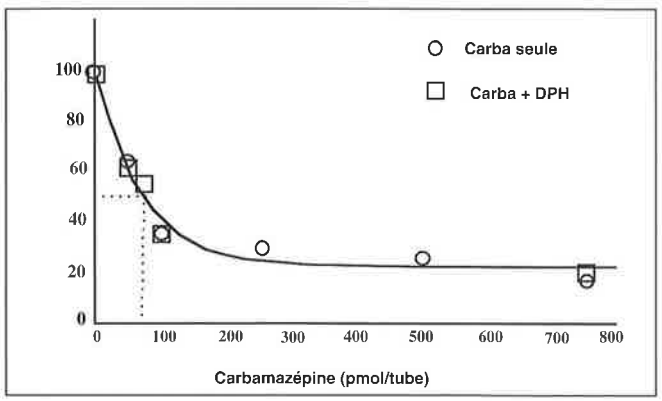


Schéma 29 - Courbes standard en mono et double CMIA.

Si on s'intéresse maintenant au dosage simultané des trois médicaments, l'étape d'analyse du mélange des trois traceurs devient plus compliquée. En effet, dans ce cas, seule la bande analytique de $Co_2(CO)_6$-Carba est indépendante alors

que nous avons un recouvrement partiel des bandes analytiques de deux autres traceurs (*schéma 30*).

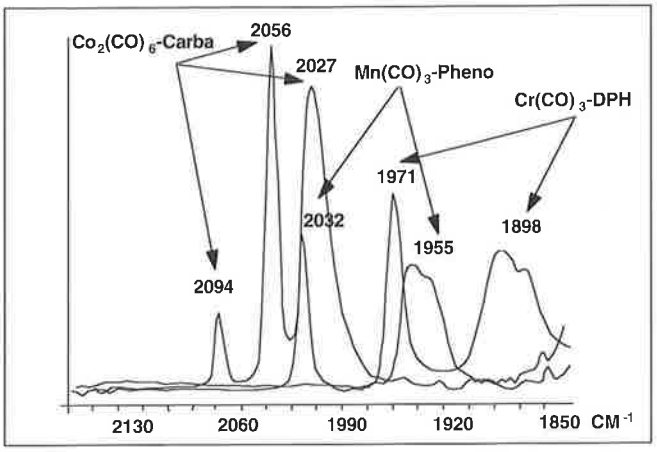


Schéma 30 - Spectres IR-TF des 3 marqueurs organométalliques.

Dans ce cas, nous avons montré qu'il est préférable d'utiliser un calcul matriciel telle que la matrice K ou l'algorithme PLS pour analyser de façon quantitative les mélanges de traceurs. Avec ces méthodes, la quantification du traceur peut se faire avec une erreur inférieure à 5 %.

Comme dans le cas du double-CMIA, nous avons montré que les courbes standard obtenues en mono et triple CMIA sont superposables.

Il semble donc que le dosage CMIA ait une carte à jouer dans le domaine des multi-immunodosages simultanés.

Perspectives et conclusion : La chimie organométallique des protéines. Résultats préliminaires

Au cours des études tant des récepteurs que des anticorps, il est apparu clairement le manque d'une chimie organométallique des protéines. Or celle-ci pourrait induire d'autres domaines d'application, tant en microscopie électronique (utilisation de clusters de métaux lourds comme agents de contraste) qu'en radiocristallographie (méthode du remplacement isomorphe multiple sur des dérivés de métaux lourds) ou en radio-immunodiagnostic/immunothérapie (radio-isotopes ^{99m}Tc, ^{186}Re, ^{188}Re).

Nous avons donc entamé des recherches dans ce sens. Toutefois, le marquage des protéines doit prendre en compte des contraintes supplémentaires liées aux caractéristiques physico-chimiques propres à ce type de molécule (solubilité, stabilité à la chaleur, au pH, aux solvants organiques, caractère polyfonctionnel), ce qui nécessite la mise au point de méthodes de marquage appropriées. Il est, de plus, souhaitable de pouvoir marquer sélectivement des sites judicieusement choisis.

La stratégie générale que nous avons choisie consiste à préparer des composés bifonctionnels possédant une entité organométallique stable et une fonction capable de se coupler sélectivement avec les fonctions amines primaires des protéines qui sont portées par les chaînes latérales des résidus lysine (et par le résidu N-terminal). Le choix particulier des fonctions amines est lié à leur caractère à la fois nucléophile et hydrophile et au fait que toutes les protéines possèdent à peu près 10 % de résidus lysine dans leur structure primaire. Leur caractère hydrophile implique que la majorité des résidus sont dirigés vers l'extérieur de la protéine donc accessibles aux réactifs chimiques. A partir de cette voie, plusieurs familles de composés ont été préparées, comme nous allons le décrire maintenant.

Réactifs préparés

La préparation des trois séries de réactifs suivants a été réalisée au laboratoire ou en collaboration avec des laboratoires extérieurs.

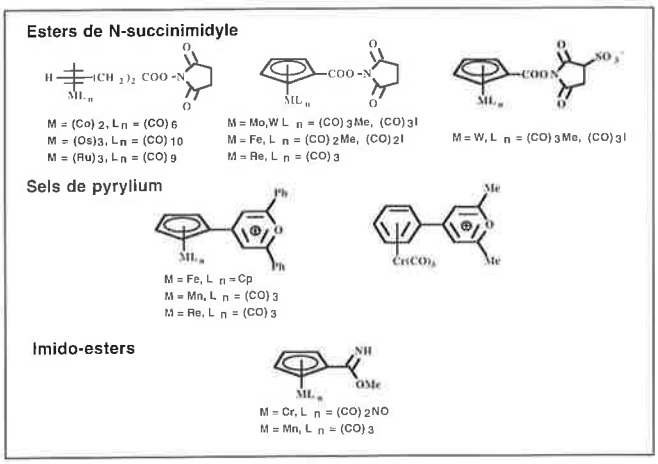


Schéma 31 - Structure des réactifs organométalliques de marquage de protéines.

Étude de la réactivité des complexes vis-à-vis de modèles

Les complexes ont été alors systématiquement testés avec des aminoacides simples (ß-alanine, lysine) et les produits obtenus caractérisés par les techniques spectroscopiques usuelles [46]. Dans tous les cas, leur structure a correspondu aux produits attendus (*schéma 32*).

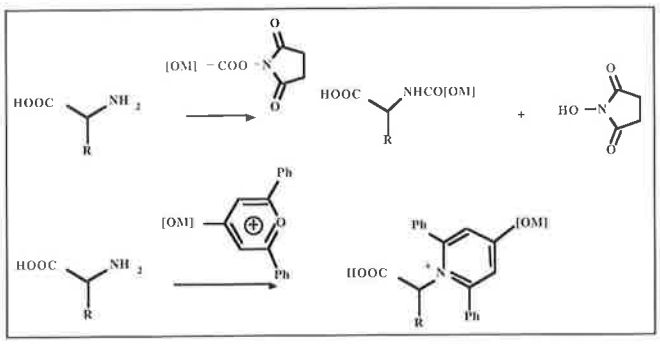


Schéma 32 - Réaction des complexes organométalliques avec un aminoacide.

La réactivité des esters de N-succinimidyle a été, par la suite, mesurée vis-à-vis d'une protéine modèle en solution aqueuse. Nous avons observé que des paramètres tels que le pH, la quantité de réactif et le temps de réaction influençaient le rendement de couplage. Avec la BSA (albumine de sérum de bœuf) comme protéine modèle qui possède 60 sites de couplage potentiels, nous avons mesuré un taux de couplage croissant avec le pH et l'existence d'un nombre

maximal de 30-35 entités métalliques conjugables par protéine [47].

L'intérêt majeur des esters de N-succinimidyle est leur facilité de préparation à partir des acides carboxyliques correspondants (qui peuvent être activés en ester *in situ*) et leur bonne réactivité en milieu aqueux. Leurs désavantages sont : leur très faible solubilité dans l'eau et le fait que leur couplage entraîne une diminution de la charge globale de la protéine. Ce point est relativement crucial surtout si on cherche à introduire un grand nombre d'entités métalliques sur la protéine. L'augmentation de l'hydrophobicité entraîne une diminution de la solubilité de la protéine qui peut être préjudiciable.

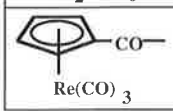
Les sels de pyrylium [48] pallient ce dernier inconvénient mais sont insolubles dans l'eau. Nous avons montré que leur mécanisme de couplage avec les protéines était identique à celui avec les amines simples.

Les imido-esters, qui sont préparés à partir des nitriles correspondants [49], sont eux relativement solubles dans l'eau et forment des amidines qui sont chargées positivement à pH physiologique.

Marquage d'un anticorps monoclonal et étude de son immuno-réactivité

En collaboration avec la société Clonatec (Paris), nous avons effectué le marquage d'un anticorps monoclonal anti-hTSH (JOSS 2-2) et la société Clonatec a effectué des mesures d'immuno-réactivité de l'anticorps marqué vis-à-vis de hTSH radiomarquée. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Tableau V - Couplage d'un anticorps monoclonal anti-TSH (JOSS 2-2) avec des complexes métal-carbonyles. Mesure du taux de couplage et de l'immuno-réactivité de l'anticorps marqué vis-à-vis de son antigène.

Complexe	Taux de couplage	Immunoréactivité (JOSS 2-2 natif = 100 %)
$H-C\equiv C-(CH_2)_2-CO-Co_2(CO)_6$	31	80
 $Re(CO)_3$	15	64

Pour les deux complexes testés, l'anticorps monoclonal marqué conserve une reconnaissance acceptable vis-à-vis de son antigène [50]. On voit que la chimie organométallique des protéines est riche en débouchés à la fois dans les domaines biophysique et biomédical, ceci grâce à l'exploitation des propriétés originales des métaux de transition et de leurs complexes.

La chimie bioorganométallique ne saurait se limiter aux quelques aspects décrits ci-dessus et que nous avons défrichés. Ils justifieraient déjà, à eux seuls, un redoublement d'efforts et une concentration de moyens. Mais on entrevoit cependant d'autres axes d'intérêt majeur comme la découverte de biosenseurs inédits ou l'analyse rapide d'ADN.

Références

[30] Vessières A., Top S., Ismail A. A., Butler I. S., Loüer M., Jaouen G., *Biochemistry*, **1988**, *27*, p. 6659-6666.

[31] Top S., Vessières A., Jaouen G., *J. Label. Comp.*, **1987**, vol. *XXIV*, n° 10, p. 1257-1263.

[32] Hirschfeld T., Quantitative FT-IR : a detailed look at the problems involved. In : *Fourier transform infrared spectroscopy. Applications to chemical systems* (Ferraro J. R., Basik L. J.), eds AP, NY 193-242 **1979**.

[33] Salmain M., Vessières A., Jaouen G., Butler I. S., *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, p. 2323-2329.

[34] Vessières A., Jaouen G., Salmain M., Butler I. S., *Appl. Spectrosc.*, **1990**, *44*, p. 1092-1094.

[35] Varenne A., Vessières A., Salmain M., Brossier P., Jaouen G., *J. Immunol. Methods*, **1995**, *186*, p. 195-204.

[36] Salmain M., Vessières A., Brossier P., Butler I. S., Jaouen G., *J. Immunol. Methods* , **1992**, *148*, p. 65-75.

[37] Varenne A., Vessières A., Brossier P., Jaouen G. , *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1994**, *84*, p. 81-92.

[38] Philomin V., Vessières A., Jaouen G., *J. Immunol. Methods*, **1994**, *171*, p. 201-210.

[39] Morgan C. R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1966**, *123*, p. 230-233.

[40] Wians F. H., Dev J., Powell M. M., Heald J. I., *Clin. Chem.*, **1986**, *32*, p. 887-890.

[41] a) Hemmilä I. A., Holttinen S., Pettersson K., Lövgren T., *Clin. Chem.*, **1987**, *33*, p. 2281-2283.
b) Saarma M., Jarvekulg L., Hemmilä I., Siitari H., Sinijarv R., *J. Virol. Methods*, **1989**, *23*, p.

[42] a) Dean K. J., Thompson S. G., Burd J. F., Buckler R. T., *Clin. Chem.*, **1983**, *29*, p. 1051-1056.
b) Blake C., Al Bassam M. N., Gould B. J. *et al.*, *Clin. Chem.*, **1982**, *28*, p. 1469-1473.

[43] Xu Y. Y., Petterson K., Blomberg K., Hemmilä I. A., Likola H., Lövgren T., *Clin. Chem.*, **1992**, *38*, p. 2038-2043.

[44] a) Kricka L. J., *Clin. Chem.*, **1992**, *38*, p. 327-328.
b) Ekins R., Chu F. W., *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, p. 369-370.

[45] Varenne Anne, thèse de l'université Paris VI, **1994**.

[46] Gorfti A., Salmain M., Jaouen G., McGlinchey M. J., Bennouna A., Mousser A., *Organometallics*, **1996**, *15*, p. 142-151.

[47] Salmain M., Gunn M., Gorfti A., Top S., Jaouen G., *Bioconjugate Chem.*, **1993**, *4*, p. 424-433.

[48] Salmain M., Malisza K. L., Top S., Jaouen G., Senechal-Tocquer M. C., Caro B., *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, p. 655-659.

[49] Blanalt S., Salmain M., Malézieux B., Jaouen G., *Tetrahedron Let.*, **1996**, 37, p.6561-6564.

FLAMEL TECHNOLOGIES

Parc Club du Moulin à Vent
33, avenue du Docteur-G.-Lévy
69693 VÉNISSIEUX CEDEX
Tél. : 78.77.68.04 - Fax : 78.01.18.59