

Les cryptates et leurs applications au domaine de la santé

Hervé Bazin

Résumé

Les cryptants constituent une famille de composés polycycliques complexant des cations. En 1987, leur découverte et celle des éthers couronnes, qui ont ouvert la voie vers la chimie supramoléculaire, ont été couronnées par le prix Nobel de chimie décerné conjointement à Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn et Charles J. Pedersen. Les molécules les plus couramment utilisées dans la chimie supramoléculaire sont définies dans cet article, ainsi que la nomenclature des éthers couronnes et des cryptants. Les cryptates, par leur caractère lipophile, permettent entre autres de « dissoudre » des sels minéraux dans un solvant organique anhydre. Les propriétés chimiques des contre-ions sont affectées, ce qui permet d'obtenir des ions très nucléophiles et de marquer ainsi au fluor 18 des molécules pour l'imagerie médicale. Les propriétés photophysiques des cations séquestrés sont profondément modifiées : ce phénomène est mis à profit dans les cryptates photoactifs complexant des ions lanthanides. Le processus de photosensibilisation des lanthanides par des groupes aromatiques ainsi que les techniques de fluorescence en temps résolu et de transfert d'énergie résonant (RET) sont décrits. Les cryptates sont ainsi des traceurs fluorescents utilisés dans le domaine du diagnostic médical (TRACE[®]) et la recherche pharmaceutique (HTRF[®]) pour le criblage de chimiothèques afin de découvrir de nouveaux médicaments.

Mots-clés

Criblage à haut débit, lanthanide, fluorescence en temps résolu, cryptates, radiofluorination.

Abstract

Cryptates and their healthcare applications

Cryptands constitute a family of polycyclic compounds complexing cations. The 1987 Nobel Prize in chemistry was given to Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn and Charles J. Pedersen for the discovery of cryptands and crown ethers, opening the path to supramolecular chemistry. In this article, the most used molecules in this chemistry will be defined as well as cryptands and crown ethers nomenclature. Due to their lipophilic character, cryptates allow to dissolve mineral salts in an anhydrous organic solvent. The chemical properties of the counter-ions are affected, allowing to obtain highly nucleophilic ions: this being used in the ¹⁸F radiolabeling of molecules for medical imaging. The photophysical properties of the sequestered cations are deeply modified: this phenomenon is used in the photoactive cryptates complexing lanthanides ions. The photosensitivation process of lanthanides by aromatic groups as well as time resolved fluorescence and resonance energy transfer (RET) techniques will be described. Thus cryptates are fluorescent tracers used in the field of medical diagnostic (TRACE[®]) and in the pharmaceutical research (HTRF[®]) for the screening of chemical libraries for new drug discovery.

Keywords

High throughput screening, lanthanide, time-resolved fluorescence, cryptands, radiofluorination.

Les composés d'inclusion forment une classe particulière de composés appartenant à une chimie supramoléculaire où l'hôte forme une cavité dans laquelle un second composé est localisé. Ils existent à l'état naturel ; en immunologie par exemple, l'anticorps joue le rôle de l'hôte et l'antigène représente l'invité. Dans les composés d'inclusion, il n'y a pas de liaisons covalentes entre l'hôte et l'invité. Ces édifices sont maintenus par des liaisons hydrogène, ioniques ou de type van der Waals. Les cryptates constituent une nouvelle classe de composés d'inclusion, le terme cryptant indiquant que le ligand⁽¹⁾ complexe un ion ou une molécule comme s'il était enfermé dans une crypte. Le terme cryptate est apparu pour la première fois dans deux articles se faisant suite [1] qui décrivent la formation d'un complexe entre un macrohétérocycle et un cation, ce complexe étant regardé comme un composé d'inclusion pour lequel le nom de cryptate est proposé. Était également décrit pour la première fois un diaza-polyoxa-macrobicycles qui sera ensuite nommé cryptant [2], et dénommé Krypofix[™] ultérieurement. Ce cryptant représente l'équivalent tridimensionnel d'un éther couronne, ces deux molécules étant les premiers membres

de toute une famille de molécules qui constituent les éléments de la chimie supramoléculaire.

Au fil des ans, la famille s'est constituée de « lariat éthers », calixarènes (en forme de vase – *calice* –, formés d'unités dérivées d'un phénol), cyclodextrines (polyosides cycliques), porphyrines (comme le noyau tétrapyrrolique de l'hémoglobine ou de la chlorophylle) et cucurbiturils (en forme de citrouille, formés d'unités glycoluril). Certains membres, comme les cucurbiturils, ont été synthétisés dès 1905 (par Behrend), mais leur structure réelle n'a été découverte que récemment. Certains, comme les éthers couronnes, ont été découverts involontairement [3] ; d'autres, comme la chlorophylle, sont présents dans la nature. D'autres encore peuvent paraître « exotiques », comme les caténanes (du latin *catena*, chaîne) formés de deux (ou plus) macrocycles entrelacés, ou les rotaxanes (du latin *rota*, roue, et *axis*, axe) formés d'un macrocycle traversé par un axe terminé par deux « bouchons » empêchant le macrocycle de s'échapper. Un exemple d'assemblage supramoléculaire (ou supermolécule) est rapporté par J.-M. Lehn [4] : il s'agit d'un complexe chimiquement bien défini de molécules

maintenues ensemble par des liaisons non covalentes. Leurs dimensions pouvant aller de quelques nanomètres à quelques micromètres, ils permettent d'accéder à des objets nanométriques en utilisant l'approche dite « bottom-up » (du bas vers le haut) qui nécessite moins d'étapes de synthèse que ce qu'il faudrait pour synthétiser une molécule de même taille par la synthèse organique traditionnelle. C'est une sorte de « meccano » utilisant des molécules comme pièces de base. Un cas « simple » mettant en jeu deux molécules est constitué par l'ADN, sous forme de double hélice, dont les deux brins sont maintenus par un ensemble de liaisons hydrogène, de force d'empilement et de liaisons ioniques stabilisées par des cations. Le processus par lequel les assemblages moléculaires se forment est appelé auto-assemblage ou auto-organisation : on le retrouve dans l'hybridation de deux brins d'ADN qui s'associent spontanément pour donner une nouvelle structure en forme d'hélice. Cette possibilité de former des nanostructures – telles que des nanofils, nanofibres, nanogrilles – par auto-assemblage offre de nouvelles ouvertures dans des domaines aussi variés que la médecine, l'électronique ou l'industrie textile. Nous nous limiterons ici aux applications des cryptates dans le domaine biomédical.

Synthèse et nomenclature des éthers couronnes

Les éthers couronnes sont des composés hétérocycliques qui, dans leur forme la plus simple, sont des oligomères cycliques d'oxyde d'éthylène ; l'unité répétée étant le motif éthylèneoxy $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ qui se répète deux fois dans le dioxane. Pour les homologues supérieurs, plutôt que d'utiliser leur nom systématique, on préfère une nomenclature simplifiée donnant le nombre d'atomes total dans le cycle et le nombre d'oxygènes. Ainsi le 1,4,7-trioxononane formé par trois unités éthylèneoxy possédant neuf sommets et trois oxygènes sera nommé 9-couronne-3 (« 9-crown-3 »). Des analogues de ces éthers couronnes dans lesquels deux des oxygènes sont remplacés par des atomes d'azote forment une famille de diaza-macrocycles. Par exemple, le 1,10-diaza-4,7,13,16-tétraoxooctadécane sera dénommé 1,10-diaza-18-couronne-6 ou plus simplement diaza-18-couronne-6 (cette dernière appellation étant ambiguë puisque plusieurs isomères sont possibles si les positions des azotes ne sont pas précisées). Dans le cas des diaza-macrocycles tels que le 1,10-diaza-18-couronne-6, on simplifie encore la nomenclature en notant le nombre d'éléments éthylèneoxy constituant chacune des deux branches reliant les azotes : il sera ainsi nommé [2.2] et nous verrons plus loin son utilité dans la nomenclature des cryptates.

Les éthers couronnes sont connus pour leur capacité à solvater fortement les cations. Les atomes d'oxygène sont idéalement situés pour se coordonner avec un cation à l'intérieur du macrocycle alors que l'extérieur de la couronne est hydrophobe ; le résultat est que le cation devient soluble dans les solvants non polaires. La taille de la cavité au milieu de la couronne détermine la taille du cation qu'elle peut solvater. Par exemple, le 18-couronne-6 possède une haute affinité pour l'ion potassium, le 15-couronne-5 pour le sodium et le 12-couronne-4 pour le lithium. En 1967, Pedersen découvrit une méthode simple pour synthétiser un éther couronne : alors qu'il désirait préparer un agent complexant des cations divalents à partir de catéchole, il fut surpris d'isoler un sous-produit capable de complexer un

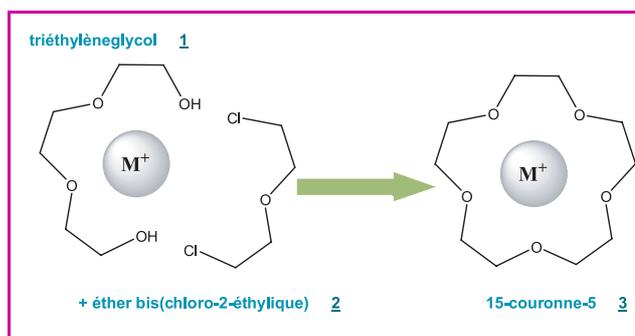


Figure 1 - Synthèse d'un éther couronne par macrocyclisation avec effet d'ion support.

ion, mais qui ne possédait pas de groupe hydroxyle ionisable [3]. Il réalisa que les polyéthers cycliques représentent une nouvelle classe d'agents complexants capable de lier les cations alcalins. Ce ne sont pas d'ailleurs les seuls ligands macrocycliques possédant une telle affinité : les ionophores comme la nonactine ou la valinomycine montrent une préférence pour l'ion potassium.

La synthèse des éthers couronnes peut être illustrée par la réaction de la figure 1 permettant d'obtenir le 15-couronne-5 à partir de triéthylèneglycol et d'éther bis(chloro-2-éthylrique) en présence de divers hydroxydes de métaux alcalins MOH [5]. Les rendements de cyclisation mettent en évidence un « effet de support » (« template effect ») par les cations adéquates, effet lié à la stabilité relative des complexes en fonction du rayon ionique de l'alcalin considéré. Dans ce cas particulier, la présence de l'ion alcalin M^+ favorise la cyclisation au détriment d'une polymérisation, comme illustré dans le tableau I.

Tableau I - Rendement de la synthèse du 15-couronne-5 (3) en fonction du rayon ionique de l'ion support.

Hydroxyde	Rayon ionique (Å)	Rendement (%)
Lithium	0,78	4
Sodium	0,98	39
Potassium	1,33	20
Césium	1,65	12

Dans le cas plus général de la synthèse d'autres macrocycles possédant, par exemple, des fonctions amides, on utilise la méthode de haute dilution afin de favoriser la cyclisation au dépend de la polycondensation. L'idée de base appliquée à la synthèse d'amides cycliques est la suivante [6] : la cyclisation intramolécule est d'ordre 1 et sa vitesse est donc proportionnelle à la concentration, tandis que la condensation intermolécule est d'ordre 2 et sa vitesse proportionnelle au carré de la concentration. Par conséquent, une réaction en milieu dilué doit favoriser la cyclisation intramolécule. Ceci s'applique par exemple à la synthèse des analogues diaza- des éthers couronnes illustrée sur la figure 2 par la réaction entre le dichlorure de l'acide 3,6-dioxooctanedioïque 4 et le 1,8-diamino-3,6-dioxooctane 5. Le diamide macrocyclique est ainsi obtenu avec des rendements de 65-75 % [7]. La réduction des fonctions amides par action de l'hydrure d'aluminium et de lithium permet ensuite de générer les deux fonctions amines secondaires du diaza-macrocycle [2.2] désiré (6). Ces diaza-macrocycles sont des intermédiaires importants utilisés dans l'une des stratégies de synthèse de cryptants (figure 2).

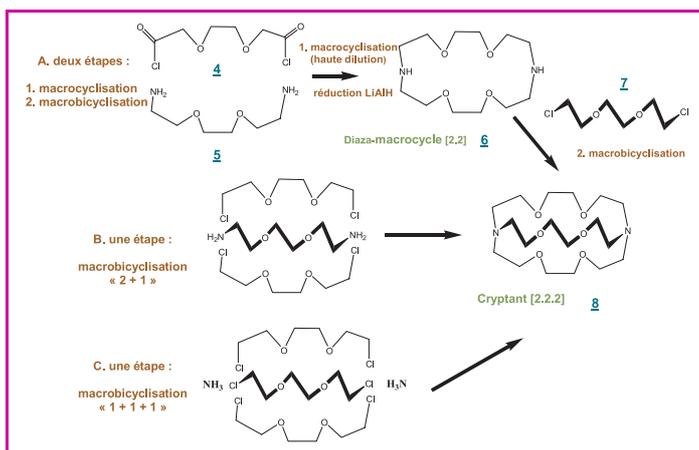


Figure 2 - Synthèses du diaza-macrocycle [2.2] (**6**) et du cryptant [2.2.2] (**8**) par les trois voies possibles : A) en deux étapes (macrocyclisation, macrobicyclisation), B) et C) en une seule étape (macrobicyclisation).

Synthèse et nomenclature des cryptants

Les cryptants représentent une famille de ligands bi- et polycycliques multidentés liant une grande variété de cations [2] ; nous nous limiterons ici à la description des cryptants de structure diamine macrobicycliques. L'un des plus communs et des plus utilisés est le cryptant de structure **8** de la *figure 2*, dont le nom recommandé par l'IUPAC⁽²⁾ est 1,10-diaza-4,7,13,16,21,24-hexaoxabicyclo[8.8.8]hexacosane (pour la nomenclature officielle, voir note (3)). Par extension aux cryptants de la nomenclature exposée ci-dessus pour les macrocycles, ce composé sera nommé cryptant [2.2.2] pour indiquer le nombre d'atomes d'oxygène (et donc de sites de liaisons) dans chacune des « branches » reliant les deux azotes des amines têtes de ponts. Ce cryptant est commercialisé sous le nom de Kryptofix 222TM. Ces cryptants montrent une affinité particulière pour les cations des alcalins, ce qui permet d'isoler des sels de potassium [8]. Le complexe formé par fluorure de potassium et le cryptant [2.2.2] donne un cryptate qui sera noté $K^+ \subset [2.2.2]$; F^- , le signe inclusion \subset montrant que le potassium est à l'intérieur de la cage. Le composé doit être considéré comme un sel formé d'un cation $K^+ \subset [2.2.2]$ et de l'anion fluorure. La forte séparation des charges fait que l'ion fluorure se comporte comme un nucléophile dur, d'où l'utilisation de ces cryptates comme réactif dans les substitutions nucléophiles. Un autre cryptant à structure diamine macrobicyclique très utilisé est un cryptant photoactif (c'est-à-dire capable d'absorber la lumière grâce aux groupes aromatiques), qui possède trois unités 2,2-bipyridines (symbolisées par BP) reliées aux deux azotes têtes de pont par des méthylènes. Ce cryptant sert à former des cryptates de lanthanides [9]. Il existe trois voies pour synthétiser un cryptant (voir l'exemple du cryptant [2.2.2] *figure 2*).

Synthèse des cryptates photoactifs

La synthèse des cryptates photoactifs se fait selon les mêmes stratégies que pour le cryptant [2.2.2] (voir *figure 2*, voie A en deux étapes). Dans l'exemple de la synthèse d'un cryptate tris-bipyridine **12** [9] (*figure 3*), on part d'un diaza-macrocycle [BP.BP] **9** formé de deux unités bipyridines pour effectuer une macrobicyclisation avec un dérivé di-bromométhyl-bipyridine **10**. Le carbonate de sodium sert ici à la fois de base et d'ion « matrice » et un cryptate de sodium

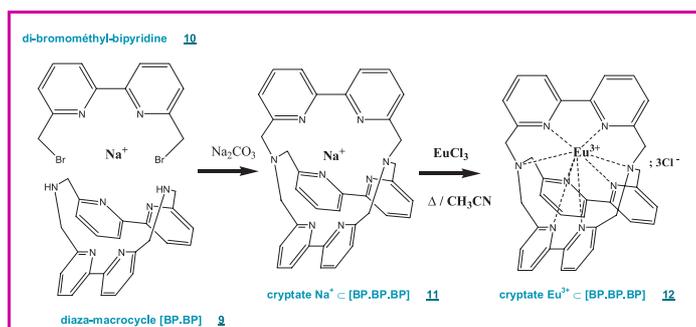


Figure 3 - Synthèse d'un cryptate photoactif de structure $Eu^{3+} \subset [BP.BP.BP]$ (**12**).

Dans un but de simplification, le bras espaceur permettant de coupler le cryptate n'est pas représenté.

$Na^+ \subset [BP.BP.BP]$ (**11**) intermédiaire est obtenu. Comme souligné plus loin à propos de la structure des ions lanthanides, la taille de l'ion europium Eu^{3+} (1,12 Å) est à peine plus grande que celle de l'ion Na^+ (0,98 Å) ; la substitution de Na^+ par Eu^{3+} se fait donc assez facilement. Cet échange est favorisé en se plaçant dans un solvant aprotique (acétonitrile) dans lequel le chlorure d'europium anhydre présente une solubilité suffisante, et en chauffant pour favoriser la réaction. On obtient ainsi le cryptate $Eu^{3+} \subset [BP.BP.BP]$; $3 Cl^-$ (**12**) dans lequel l'ion Eu^{3+} est coordonné par les azotes du ligand. Pour nommer ce cryptate, on utilise la notation condensée $Eu \subset TBP$ (TBP pour tris-bipyridine). La coordination étant plus forte qu'avec Na^+ (ou un autre cation), la réaction inverse n'est pas possible, et l'ion Eu^{3+} est définitivement séquestré dans la cage. Des cryptates renfermant d'autres hétérocycles ont également été synthétisés [10].

D'un point de vue pratique, on recherche des structures possédant : une absorption maximum ($\epsilon > 10\,000\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$) aux longueurs d'ondes des sources pulsées (lampe flash : 300-320 nm ou laser à azote : 337 nm), un rendement quantique (rapport de l'énergie émise sur l'énergie absorbée) suffisamment élevé et une émission présentant une **durée de vie**⁽⁴⁾ **longue** (ordre de la milliseconde), ainsi qu'une émission la plus monochromatique possible. On recherche de plus une **stabilité chimique** complète dans la gamme pH 1-12 ainsi qu'en présence d'ions divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ...) et de complexants (citrate, phosphate, EDTA...), et une fonctionnalité permettant le greffage aux biomolécules d'intérêt.

Application au radiomarquage du fluorodeoxyglucose par le fluor 18

Le fluorodeoxyglucose (FDG) marqué au ^{18}F est un produit radiopharmaceutique actuellement très utilisé comme traceur dans l'imagerie fonctionnelle réalisée par la tomographie par émission de positon (TEP ou PET en anglais). Il émet des positons de faible énergie (635 KeV), ce qui limite la dose absorbée par le patient, et a une décroissance radioactive caractérisée par une demi-vie de 109,7 min, ce qui est juste assez long pour permettre une synthèse radiochimique (durées et nombre des étapes forcément limitants) et assez court pour que toute radioactivité ait disparu en quelques heures après l'injection.

L'affinité du cryptant [2.2.2] pour les sels de potassium est mise à profit pour concentrer les ions fluorures produits par irradiation de l'eau enrichie en oxygène 18, formant la cible d'un faisceau de protons produit par un cyclotron.

La première synthèse de 2-fluoro-2-deoxyglucose radiomarqué au fluor 18 (^{18}F -FDG) a été effectuée en 1976 par Wolf en utilisant une méthode de fluoration électrophile. L'addition de fluor ^{18}F -F₂ sur un précurseur donnait un mélange d'isomères marqués au ^{18}F ; le ^{18}F -FDG était obtenu après séparation et hydrolyse acide. Le rendement de 8 % et le temps de synthèse de 2 h (soit environ une demi-vie pour le ^{18}F) constituaient de sérieuses limitations à la méthode ; cela permit néanmoins à l'hôpital de l'Université de Pennsylvanie de cartographier le métabolisme du glucose dans le cerveau humain. Une autre limitation majeure est que d'une part seulement 50 % du fluor radioactif peuvent être incorporés dans le précurseur, et que d'autre part, la réaction nucléaire permettant de produire le $^{18}\text{F}_2$ nécessite l'ajout de fluor naturel et produit donc du $^{18}\text{F}_2$ avec un rendement et une activité spécifique faibles (sans compter les difficultés techniques associées à un gaz radioactif et agressif !)

De nombreuses tentatives ont été faites pour développer une synthèse du FDG basée sur une substitution nucléophile. Les fluorures $^{18}\text{F}^-$ peuvent en effet être produits avec un bien meilleur rendement et une plus haute activité spécifique par irradiation cyclotronique de l'eau enrichie en oxygène 18 (^{18}O -H₂O). Un progrès majeur a été réalisé en 1986 par Hamacher *et coll.* [11] qui ont utilisé le Kryptofix 222TM comme catalyseur. Dans ces conditions, le rendement était supérieur à 50 % et le temps de réaction ramené à 50 min. Une réaction nucléophile (SN) implique l'arrivée d'un nucléophile (espèce chargée négativement) sur une molécule : le nucléophile forme ainsi une nouvelle liaison covalente avec le précurseur et déplace le groupe partant – notons que la stéréochimie (configuration) est changée dans le cas d'un centre chiral (*figure 4*).



Figure 4 - Substitution nucléophile SN₂ avec inversion de configuration.

Le nucléophile et le groupe partant X ont le même rang suivant les règles de priorité des substituants.

Dans la synthèse actuelle optimisée du ^{18}F -FDG (*figure 5*), l'ion $^{18}\text{F}^-$ est le nucléophile. Le précurseur **13** est un dérivé 1,3,4,6-tétra-O-acétylé du D-mannose portant en position 2 un groupe partant triflate (triflate = trifluorométhanesulfonate). En présence de cryptant [2.2.2] comme catalyseur et

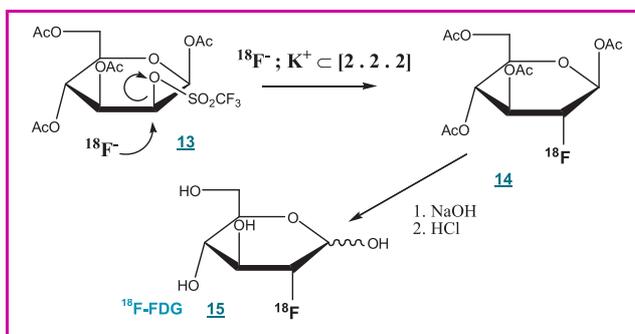


Figure 5 - Synthèse actuelle du ^{18}F -FDG par substitution nucléophile de $^{18}\text{F}^-$ sur un dérivé 1,3,4,6-tétra-O-acétylé du D-mannose (**13**) en présence de cryptate [2.2.2].

d'acétonitrile comme solvant, les ions fluorures ont un caractère particulièrement nucléophile, la charge négative étant très concentrée du fait que les ions sont « nus » (dans une solution aqueuse de fluorure de potassium, ils restent associés au cation sous forme de paires d'ions ; l'ensemble étant solvaté par des molécules d'eau, le caractère nucléophile est alors moins marqué). La substitution nucléophile du triflate par le fluorure sur le carbone 2 (chiral) se fait avec inversion de configuration : le nouveau composé formé (**14**) appartient donc à la série du D-glucose. Par saponification des acétates (NaOH) puis neutralisation (HCl), on obtient le ^{18}F -FDG **15**.

Concrètement, l'acide fluorhydrique produit dans la cible (^{18}O -H₂O) du cyclotron est neutralisé par du carbonate de potassium (K₂CO₃), formant du fluorure de potassium. L'ion potassium qui a un rayon ionique de 1,33 Å est facilement complexé dans la cavité du Kryptofix 222TM.

Ces progrès dans la synthèse du fluorodeoxyglucose et dans l'automatisation de la production permettent ainsi de produire industriellement du FDG radiomarqué distribué journalièrement dans les centres hospitaliers. Ces examens permettent un diagnostic plus précoce de certains cancers. Notons également que c'est un outil de recherche qui a révolutionné notre connaissance dans le fonctionnement du cerveau et dans l'approche de désordres neurologiques. La plate-forme d'imagerie Neurospin (Institut d'Imagerie Biomédicale, I2BM) dans l'enceinte du centre CEA de Saclay, entièrement destinée à l'étude du cerveau humain, normal et malade, complète les installations existantes du service hospitalier Frédéric Joliot (CEA-DSV) à Orsay dédiées à l'imagerie radioisotopique TEP.

Principe de l'utilisation du marquage luminescent au criblage

Les lanthanides (appelés plus communément « terres rares ») sont formés des quinze éléments allant du lanthane (N = 58) au lutétium (N = 71). Ils correspondent à un remplissage graduel de la couche formée par les électrons 4f, qui est elle-même blindée par la sous-couche externe 5s²5p⁶ (cette couche étant complète). Ainsi, « vu de l'extérieur », les différents lanthanides sont chimiquement très semblables (et donc relativement difficiles à séparer les uns des autres) et leur rayon atomique diminue lorsque N augmente (contraction des lanthanides). Le rayon ionique décroît de l'ion La³⁺ (1,21 Å) en passant par Eu³⁺ (1,12 Å) et Tb³⁺ (1,09 Å), jusqu'à Lu³⁺ (1,03 Å), l'ion europium a ainsi une taille intermédiaire entre Na⁺ (0,98 Å) et K⁺ (1,33 Å).

Une autre conséquence du blindage par les couches externes leur confère des propriétés photophysiques remarquables, en particulier pour le terbium et l'europium. Les ions lanthanides montrent différents types de transitions électroniques, entre autres des transitions f-f dites « interdites », caractérisées par des coefficients d'absorption molaires souvent inférieurs à 1 M⁻¹.cm⁻¹. Les transitions sont représentées par des pics d'absorption fins. La plupart de ces ions sont luminescents, soit fluorescents (comme PrIII, NdIII, HoIII, ErIII et YbIII) ou phosphorescents (comme SmIII : orange ; EuIII : rouge ; GdIII qui émet dans l'UV ; TbIII : vert ; DyIII : jaune et TmIII : bleu). Leur émission couvre le spectre de l'UV au visible et jusqu'au proche infrarouge (de 0,3-2,2 μm) ; ils sont d'ailleurs utilisés comme phosphores trichromiques dans les écrans couleur. Leur excitation directe est très peu efficace, c'est pourquoi on utilise l'excitation indirecte (appelée sensibilisation ou effet d'antenne). Ce mode d'excitation se fait en trois étapes : 1) la lumière est

absorbée par un chromophore situé dans l'environnement immédiat de l'ion lanthanide au travers de ligands organiques (chromophores) ; 2) l'énergie est transférée sur un des états excités de l'ion ; 3) l'ion métallique émet de la lumière. Une multitude de ligands organiques portant des chromophores aromatiques tels que les groupes pyridine, bipyridine, terpyridine, quinoline substitués ont été étudiés. On peut décrire le phénomène comme un transfert de l'énergie ligand (S1) → ligand (T1) → Ln*. Ce transfert peut être optimisé en ajustant la différence d'énergie entre le niveau triplet le plus bas du ligand (T1) et le niveau émissif du lanthanide (Ln*) (pour plus de détails, voir [12]). Comme noté plus haut, certains lanthanides tels que le terbium (TbIII) ou l'euprium (EuIII) présentent un phénomène de phosphorescence caractérisé par une durée de vie⁽⁴⁾ de l'ordre de 100 μ s à quelques millisecondes – par définition, la phosphorescence implique une transition entre deux états se faisant avec changement de parité (par exemple triplet vers singulet). Les phénomènes de désexcitation radiative présentant une longue durée de vie de luminescence – ce qui nous intéresse pour l'utilisation comme marqueur luminescent – sont en compétition avec des phénomènes de désexcitation non radiative qui constituent autant de phénomènes provoquant une extinction de la fluorescence (« quenching »). Cette extinction est provoquée soit par interaction avec les molécules d'eau du solvant, soit par d'autres molécules présentes, par exemple des molécules biologiques (dans le cas où le milieu contient du sérum) ou des molécules synthétiques (cas général pour le criblage d'une chimiothèque).

Un cryptate photoactif permet d'encapsuler un ion lanthanide luminescent (dont l'excitation directe est très peu efficace en solution aqueuse) dans la cavité d'un cryptate formé de ligands organiques servant de chromophores (tels que des bipyridines) et de « blindage », afin de créer une supermolécule hybride possédant les propriétés d'absorption du ligand organique et les propriétés d'émission optimum du lanthanide considéré [9, 13]. La supériorité d'une telle structure par rapport à d'autres complexes de type chélatés étudiés antérieurement vient du fait que la structure cryptate permet, en grande partie, de soustraire l'ion lanthanide aux interactions avec le milieu, et donc de limiter les phénomènes d'extinction dus aux molécules d'eau. Cette protection est plus ou moins complète en fonction de la structure considérée (taille de la cage) et la présence d'ions fluorures permet de renforcer cette protection [14].

Les cryptates présentent également une stabilité totale (ce qui n'est généralement pas le cas des chélatés), même dans les conditions acides (pH 1 à 2) utilisées lors la purification des peptides synthétiques, ainsi qu'en présence de cations divalents (Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺) ou d'agents chélatants (EDTA, EGTA) classiquement utilisés dans les essais biochimiques.

Principe de la mesure de fluorescence en temps résolu (TRF : « time resolved fluorescence »)

Les marqueurs fluorescents et luminescents sont théoriquement les systèmes les plus sensibles après les marqueurs radioactifs ; en revanche, un certain nombre de facteurs sont limitant quand aux applications pratiques :

• Le phénomène de « bruit de fond de fluorescence »

C'est l'émission parasite provenant des composants optiques de l'appareil de mesure ainsi que de la fluorescence du milieu lui-même. On essaie de limiter au maximum le premier facteur lié à l'appareil, mais la fluorescence parasite du milieu est par essence non contrôlable.

• La mesure en temps résolu

On peut s'affranchir de cette limitation en utilisant justement un marqueur luminescent tel qu'un complexe de lanthanide présentant une émission à longue durée de vie. Suite à une excitation pulsée, l'ensemble des molécules présentes dans le milieu émet, l'émission de fluorescence parasite (bruit) provenant du milieu disparaît rapidement dans les 100 μ s qui succèdent l'excitation pulsée. En mesurant l'émission après un délai t_D de 50-100 μ s, on mesure alors spécifiquement le signal du marqueur présentant une durée de vie longue (figure 6). Les molécules fluorescentes « classiques » présentant une durée de vie « courte », typiquement de l'ordre de quelques nanosecondes, elles ne sont pas détectables en temps résolu. On augmente ainsi considérablement le rapport signal/bruit et de ce fait, la sensibilité du dosage. Par exemple, si on ajoute à une solution de cryptate Eu c TBP (à une concentration nanomolaire donnant une émission $I_{620} = 40\,000$ ufa) de la fluorescéine (à une concentration micromolaire donnant une émission $I_{620} = 20\,000$ ufa), de façon à mimer un bruit de fond dû à la contribution d'un composé fortement fluorescent, une mesure en mode « fluorescence continue » donne effectivement un signal à 620 nm fortement pollué par la fluorescence de la fluorescéine. En faisant une mesure en temps résolu, après un délai de 50 μ s, la fluorescence parasite est virtuellement totalement éliminée [15]. Il existe maintenant dans le commerce de nombreux fluorimètres permettant de faire des mesures en temps résolu dans des plaques de microtitration.

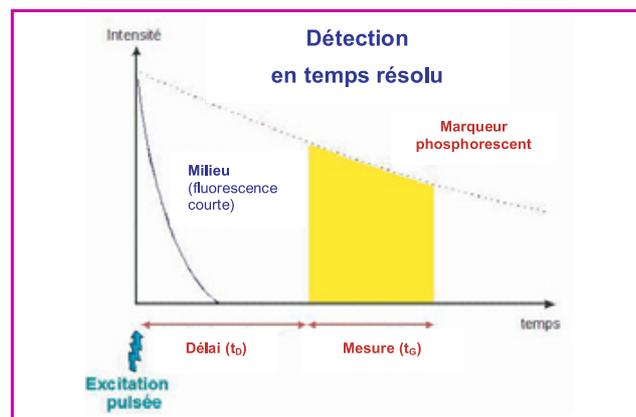


Figure 6 - Principe de la mesure de fluorescence en temps résolu.

Principe du transfert d'énergie non radiatif (ou transfert d'énergie résonant)

Lorsqu'une molécule (ou un ion) se désexcite en émettant de la lumière, cette lumière peut être absorbée par une molécule présente dans le milieu : on parle alors de transfert trivial (ou radiatif) ; ce phénomène décroît en fonction de l'éloignement entre les molécules en suivant les lois de l'optique géométrique. Un autre phénomène découvert par Förster en 1948 consiste en un transfert non radiatif (ou résonant) entre la molécule (ou l'ion) excitée nommée donneur et une molécule nommée accepteur : dans ce cas, aucun photon n'est échangé ; il y a un couplage dipôle-dipôle entre les électrons des niveaux excités du donneur et les électrons de l'accepteur. Comparé au transfert trivial, ce phénomène décroît plus rapidement au travers de l'espace en suivant une loi en $1/d^3$. La gamme des distances impliquées étant du même ordre que la taille des macromolécules d'intérêt biologique, cette

technique nommée FRET (pour « Förster resonance energy transfert ») a de nombreuses applications et représente une technique de choix pour mesurer l'interaction entre biomolécules ainsi que les modifications de conformation (on trouvera plus de détails dans un excellent et récent ouvrage en français [16] ; voir également [17] pour des compléments concernant la fluorescence et la luminescence).

Principe du TR-FRET et de la méthode HTRF®

Pour étudier l'interaction entre deux molécules, il existe des méthodes dites hétérogènes, c'est-à-dire utilisant une séparation physique. C'est par exemple le cas des méthodes de criblage des ligands de récepteurs : les récepteurs sont immobilisés sur un filtre, on incube dans un milieu contenant un ligand potentiel sous une forme « marquée », on lave le filtre pour éliminer l'excès de molécules marquées et on mesure le signal provenant du marqueur « lié ». Les méthodes hétérogènes ont l'inconvénient de perdre toute information sur les aspects cinétiques de l'interaction, justement à cause de l'étape de séparation.

En revanche, dans le cas de méthodes dites homogènes, les mesures se font directement dans le milieu, sans nécessiter de séparation physique des excès de molécules marquées. Il faut arriver à discriminer entre la fraction molaire de molécules marquées en interaction et l'excès des molécules marquées libres dans le milieu.

Dans la méthode HTRF® (« homogeneous time resolved fluorescence »), développée par CISbio dans les années 1990 [18-19], on marque l'une des biomolécules avec un donneur phosphorescent (cryptate d'euporium émettant vers 620 nm) et l'autre molécule avec un accepteur fluorescent. Si les molécules interagissent, de par leur proximité, il y a une possibilité de transfert non radiatif entre donneur et accepteur. Une partie de l'énergie étant transférée, la luminescence du donneur diminue légèrement et en contrepartie, on observe une émission de fluorescence de l'accepteur qui, dans ce cas particulier, se fait avec une durée de vie « longue » atypique de l'accepteur s'il est excité directement.

En choisissant bien l'accepteur, de façon à ce que sa longueur d'onde d'émission (665 nm) tombe dans une fenêtre où l'émission du donneur est négligeable, on peut détecter sélectivement (sélectivité spectrale) l'émission du donneur et celle de l'accepteur. Grâce à la mesure en temps résolu, on peut détecter sélectivement le signal provenant de l'accepteur lié (sélectivité temporelle).

Les phénomènes de « filtre interne » et la parade

L'effet de filtre interne provient de l'absorption de la lumière d'excitation par les molécules présentes dans le milieu. Rappelons que pour une absorbance de 1, il n'y a plus que 10 % de la lumière incidente qui vont exciter les molécules, donc une perte de signal d'un facteur 10. Dans le cas d'un dosage réalisé à partir d'un milieu biologique tel qu'un sérum, l'absorbance (ou densité optique) résiduelle du milieu vers 300-350 nm (due principalement aux protéines dont l'absorbance maximum se situe vers 280 nm) est loin d'être négligeable. Dans le cas d'une application dans le domaine du criblage de chimiothèques, la diversité des molécules étant grande, la variabilité de leurs propriétés optiques est également grande et ce phénomène de filtre peut être encore plus limitant. Une façon de compenser cette absorption consiste à utiliser une source plus intense, d'où l'utilisation d'une excitation laser sur les appareils les plus performants. Mais la meilleure parade à ce phénomène, pour

compenser la variation de qualité optique du milieu, consiste non pas à mesurer directement une fluorescence, mais le **ratio** entre deux signaux de fluorescence. Les deux signaux étant affectés de la même façon par le milieu, ce ratio est indépendant du milieu [18-19].

Les phénomènes d'extinction de fluorescence

Ces phénomènes ont pour effet d'éteindre la luminescence, soit en diminuant l'intensité, soit en diminuant la durée de vie de l'émission. Dans le cas des complexes d'euporium, ils proviennent soit de réactions redox entre l'ion euporium à son niveau excité et un réducteur présent dans le milieu, soit de phénomènes de transfert d'énergie entre l'état excité du cryptate et une molécule présente dans le milieu (la molécule possédant un recouvrement entre son spectre d'absorption et le spectre d'émission de l'euporium). Il est évident que dans le domaine du criblage de chimiothèques, la diversité des molécules fait que la probabilité qu'une de ces molécules interfère avec l'émission du marqueur est assez élevée ! Pour qu'une méthode de criblage soit robuste, il faut minimiser l'impact de ces interférences. Une des solutions est donc de protéger l'ion euporium dans la cavité d'un cryptate. Des réactifs, principalement destinés à l'industrie pharmaceutique, sont commercialisés par CISbio sous le nom HTRF® et sont utilisés pour la découverte de nouveaux médicaments.

Application des cryptates d'euporium dans le domaine du criblage

Mise au point de nouveaux médicaments, chimiothèques et criblage à haut débit

On peut se représenter le processus de mise au point des médicaments comme un ensemble « d'idées » et de « cibles » qui pénètrent à une extrémité d'un pipeline et un médicament candidat, prêt pour les essais cliniques, qui en ressort à l'autre extrémité. La mise au point de médicaments, depuis l'identification de la cible jusqu'aux essais cliniques de phase I, peut se découper en sept jalons : 1) détermination de la cible biologique, 2) criblage à haut débit de chimiothèques et découverte initiale, 3) touches (hits), 4) tête de file (« leads compounds »), 5) médicament candidat aux essais précliniques, 6) médicament candidat aux essais cliniques et 7) essai de phase I. Les touches sont des structures qui présentent une activité *in vitro* dans l'essai initial utilisé en criblage ; les têtes de file présentent en plus une activité *in vivo*, une spécificité et un mode d'action établis et sont acceptables d'un point de vue pharmacologique. Il y a des moments critiques dans le processus où l'équipe doit décider de « continuer ou non » la mise au point du médicament. À ces moments, elle doit évaluer si la mise au point réussie du composé compensera les dépenses associées à la prochaine étape. Il peut s'écouler quinze ans entre la découverte d'une molécule jusqu'à l'homologation. L'obtention d'un seul médicament approuvé peut nécessiter la découverte initiale de 5 000 à 10 000 composés actifs possibles. Parmi ceux-ci, seuls 250 seront identifiés comme têtes de file candidates et feront l'objet d'essais précliniques. Finalement, cinq composés candidats pourront faire l'objet d'essais cliniques, et un seul sera approuvé !

La tendance actuelle dans le domaine du criblage à haut débit est d'utiliser des volumes de plus en plus petits en bénéficiant de réactifs et de technologies de pipetage et d'automatisation sophistiqués. Malgré son extension rapide, le criblage à haut débit est une méthode relativement nouvelle

pour l'industrie pharmaceutique. Les premières plaques de microtitration au format 384 puits ont été introduites en 1992 et les premières plaques de 1 536 puits en 1997. Le défi sera de voir jusqu'où on peut réduire les volumes des puits.

Chimiothèques

Pour identifier des touches ou des têtes de file, il faut avoir accès à une grande variété de structures chimiques. On utilise une chimiothèque⁽⁵⁾ où les composés sont dissous dans le DMSO et dilués à 10-100 μM dans les puits immédiatement avant leur criblage. Il y a au moins trois grandes sources de composés chimiques diversifiés :

- **Les banques classiques de composés synthétiques ciblés** contiennent des composés bien définis dont le degré de complexité varie de relativement simple à très complexe. Ces composés sont souvent des intermédiaires dans la biosynthèse des cibles ou des analogues.
- **Les banques combinatoires de composés synthétiques** peuvent générer un grand nombre de composés. La structure ciblée est fondée sur la facilité de synthèse et est relativement simple.
- **Les banques de produits naturels** renferment des structures complexes non transformées par l'imagination humaine. Ces composés ont évolué dans la nature pour atteindre des cibles protéiques d'origine naturelle ; environ 50 % des médicaments existant et des médicaments en train d'être mis au point sont issus de produits naturels.

Un exemple d'essai HTRF[®] : le criblage des inhibiteurs de protéases

Il existe actuellement deux types de médicaments homologués de structure peptidique issus du criblage à haut débit : un inhibiteur de la protéase de HIV-1 (pour le traitement du sida) et un inhibiteur d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'angiotensine (pour le traitement de l'hypertension), ainsi qu'une dizaine de molécules (phases précliniques, phase II ou III) ciblant des affections telles que rhume, hépatites, cancers, arthrite et troubles de la coagulation, d'où l'intérêt porté à ces molécules peptidiques. Compte tenu du délai nécessaire aux études cliniques, entre la validation d'une molécule et son homologation, il est probable que le nombre de médicaments basés sur des structures peptidiques ou peptido-mimétiques va aller en augmentant.

L'exemple qui suit (*figure 7*) présente un essai permettant un criblage de chimiothèques dans le but de découvrir des inhibiteurs de protéases au travers de la technique HTRF[®] et des kits développés par CISbio. On utilise un peptide synthétique doublement marqué⁽⁶⁾ portant à son extrémité N-terminale un cryptate d'europlum et à l'extrémité C-terminale un accepteur fluorescent à 665 nm. En l'absence d'activité protéase, le peptide intact portant le donneur (cryptate) et l'accepteur, il y a transfert d'énergie non radiatif du cryptate vers l'accepteur ; la luminescence du cryptate est alors moins intense et l'énergie transférée sur l'accepteur est réémise par celui-ci sous la forme d'une émission à 665 nm présentant une durée de vie longue. Sous l'action d'une protéase, le peptide étant coupé, le transfert d'énergie ne peut plus avoir lieu ; la luminescence nominale du cryptate à 620 nm est alors maximale et l'accepteur n'émet plus du tout de fluorescence à 665 nm. En présence d'un inhibiteur de l'activité protéase, l'intégrité du peptide étant maintenu, l'émission à 665 nm présentant une durée de vie longue est observée, démontrant la présence d'un effet inhibiteur sur l'enzyme.

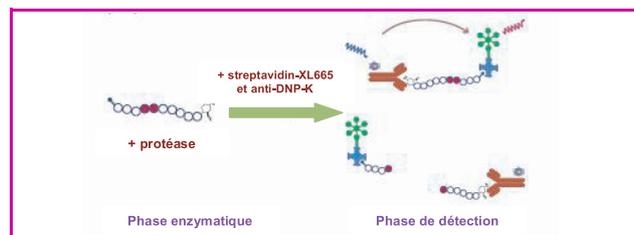


Figure 7 - Schéma d'un bio-essai utilisé pour le criblage des inhibiteurs de protéases.

Par action d'une protéase, le peptide est coupé ; il n'y a pas de FRET et seul le donneur (cryptate luminescent) émet sa luminescence à 620 nm. Si un inhibiteur de protéase est présent, le peptide reste intact ; il existe donc un FRET entre le donneur et l'accepteur fluorescent qui émet alors un signal à 665 nm présentant une longue durée de vie.

L'industrie pharmaceutique recherche maintenant une façon de produire des touches en utilisant des technologies et des essais qui soient plus physiologiques que ceux utilisés précédemment dans le processus de criblage, ceci afin de mimer au plus près les mécanismes qui auront lieu *in vivo*. Un domaine qui bénéficierait de ces techniques est le criblage fonctionnel des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), et principalement les voies impliquant Gq/Gi, qui sont actuellement assez souvent explorées, au travers d'une mesure des flux calciques. Dans des conditions plus physiologiques, ces mesures permettraient de réduire le nombre des faux positifs et des artefacts créés par ces méthodes actuelles. Des essais HTRF[®] ont également été développés dans le but de doser des métabolites (cAMP, IP-1) impliqués dans les voies de signalisation après stimulation de récepteurs membranaires puis lyse des cellules [20]. Il est possible d'utiliser la technique HTRF[®] en combinaison avec des cellules vivantes ayant subi une transfection permettant de faire exprimer par exemple des récepteurs membranaires recombinants (récepteurs au GABA) présentant une séquence de reconnaissance (tag). On utilise alors des cryptates pyridine-bis-bipyridine moins sensibles à l'extinction de fluorescence, même en absence d'ions fluorures. On peut alors visualiser directement les interactions entre des protéines de surface des cellules vivantes [20]. Cette approche innovante permettant d'améliorer l'étude des complexes protéiques membranaires impliqués dans les communications intercellulaires continue à être développée à l'Institut de génomique fonctionnelle de Montpellier. Elle permet maintenant de marquer directement, de façon unique, quantitative et spécifique, des récepteurs membranaires recombinants comportant un fragment protéique nommé SNAP-TAG, et cela à la surface de cellules vivantes. Le SNAP-TAG possède une activité enzymatique dite « suicide » qui fait que son substrat, un dérivé O-benzyl-guanine, provoque l'alkylation d'une cystéine du site actif. Si le substrat O-benzyl-guanine porte un marqueur fluorescent sur le groupe benzyle, il y aura transfert du marqueur fluorescent et donc formation d'une liaison covalente entre la protéine et ce marqueur. Par un « double marquage » de deux récepteurs, on peut observer un transfert d'énergie non radiatif du cryptate porté par un des récepteurs vers l'accepteur porté par un deuxième récepteur, lorsque ces deux récepteurs dimérisent [21].

Application des cryptates dans le domaine du diagnostic médical au travers de TRACE[®]

TRACE[®] (« time resolved amplified cryptate emission ») est le principe de mesure utilisé dans les kits



Figure 8 - Lecteur Kryptor® pour les immunodosages TRACE® utilisant un cryptate d'euporium.

d'immunodiagnostic commercialisés par BRAHMS au travers de l'instrument Kryptor® (figure 8) qui mesure le signal émis à partir d'un immunocomplexe en phase homogène⁽⁷⁾. La base de la technologie TRACE® est également un transfert d'énergie non radiatif entre un cryptate d'euporium et un accepteur émettant à 665 nm. La proximité du donneur et de l'accepteur dans la formation d'un immunocomplexe autorise le transfert d'énergie et l'apparition d'un signal à 665 nm (de longue durée de vie) qui est proportionnel à la concentration de la substance analysée [22]. Kryptor®⁽⁷⁾ permettant une mesure en temps réel à double longueur d'onde, une mesure ratiométrique permet ici aussi de corriger les fluctuations de signal dues au milieu biologique (sérum), les propriétés optiques (absorption, fluorescence parasite, turbidité) pouvant être très variables d'un échantillon à l'autre.

Conclusion

Concernant les applications aux marquages radioisotopiques, le cryptate utilisé actuellement donne entièrement satisfaction. Les évolutions viendront du développement de nouveaux précurseurs permettant l'incorporation du fluor par voie nucléophile dans des synthèses utilisant actuellement une réaction électrophile ; on attend ainsi une augmentation du rendement radiochimique. Les applications au domaine de l'imagerie pourraient bénéficier de futurs cryptates d'ytterbium possédant une émission dans le proche infrarouge dans une fenêtre où l'absorption par l'hémoglobine est minimum. Les applications au criblage à haut débit et au diagnostic pourraient bénéficier de nouveaux cryptates possédant un chromophore adapté au terbium et pouvant, en théorie, donner des complexes avec des rendements quantiques plus élevés. La synthèse de nouveaux complexes présentant un bruit de fond encore plus réduit et une brillance plus élevée permettrait de repousser les limites dans la miniaturisation ainsi que dans la sensibilité des bio-essais et des immunoessais. Il est également possible d'utiliser des cryptates pour réaliser des récepteurs spécifiques [23] permettant la détection de molécules organiques (aminoacides ou diacides du métabolisme) ou d'ions minéraux, par une réponse électrochimique ou lumineuse. Ainsi récemment une molécule associant un cryptate de néodyme et un éther couronne [24] a montré une modulation de l'émission (proche infrarouge) du néodyme en fonction de la liaison d'un ion baryum sur l'éther couronne adjacent.

Notes et références

- (1) En chimie, un *ligand* est un atome, ion ou molécule qui généralement donne un ou plus de ses électrons au travers d'une liaison de coordination, ou partage ses électrons par une liaison covalente avec un (ou plusieurs) atome ou ion central (le ligand joue le rôle d'une base de Lewis). Peu d'exemples existent où la situation est inversée.
- (2) IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.
- (3) "Ring systems" : www.chem.qmul.ac.uk/iupac/class/rings.html ; "Crown" et "cryptand" : www.chem.qmul.ac.uk/iupac/gtpoc/CoCy.html#34
- (4) *Durée de vie de luminescence* : temps τ au bout duquel l'intensité de l'émission initiale I_0 est divisée par e , la base des logarithmes népériens. La décroissance de l'intensité suit une loi en général mono-exponentielle : $I = I_0 e^{-t/\tau}$
- (5) Les organismes de recherche publique se sont regroupés pour créer la chimiothèque nationale ; voir <http://chimiotheque-nationale.enscm.fr>
- (6) Pour plus de détails, voir www.htrf.com/technology/htrftheory/tr_basics
- (7) Pour plus de détails, voir www.cezanne.fr
- [1] Dietrich B., Lehn J.-M., Sauvage J.-P., Diaza-polyoxa-macrocycles et macrobicycles, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, *34*, p. 2885 ; *ibid*, Cryptates, p. 2889.
- [2] Dietrich B., Cryptands, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, **1996**, *1*, p. 153.
- [3] Pedersen C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, p. 7017.
- [4] Lehn J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, p. 1838.
- [5] Bowsher B.R., Rest A.J., The use of alkali metal hydroxides in the template synthesis of 15-crown-5, *Inorg. Chim. Acta*, **1980**, *45*, p. L5.
- [6] a) Ruggli P., *Ann.*, **1912**, *302*, p. 92 ; b) Rossa L., Vögtle F., *Topics in Current Chem.*, **1983**, *113*, p. 1.
- [7] a) Dietrich B., Lehn J.-M., Sauvage J.-P., Diaza-polyoxa-macrocycles et macrobicycles, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, *10*, p. 2885 ; b) Dietrich B., Lehn J.-M., Sauvage J.-P., Blanzat J., Cryptates X: Synthèses et propriétés physiques de systèmes diaza-polyoxa-macrocycliques, *Tetrahedron*, **1973**, *29*, p. 1639.
- [8] Kim J., Ichimura A.S., Huang R.H., Redko M., Phillips R.C., Jackson J.E., Dye J.L., Crystalline salts of Na⁺ and K⁺ (alkalides) that are stable at room temperature, *J. of the Amer. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, p. 10666.
- [9] Alpha B., Lehn J.-M., Mathis G., Energy transfer luminescence of Europium(III) and Terbium(III) cryptates of macrobicyclic polypyridine ligands, *Angew. Chem. Int. Ed. in Engl.*, **1987**, *26*, p. 266.
- [10] Lehn J.-M., Regnouf de Vains J.-B., Synthesis of macrobicyclic cryptates incorporating bithiazole, bisimidazole and bipyrimidine binding subunits, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, p. 2209.
- [11] Hamacher K., Coenen H.H., Stöcklin G., Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopoly-ether supported nucleophilic substitution, *J. Nucl. Med.*, **1986**, *27*, p. 235.
- [12] Bünzli J.-C.G., Piguet C., Taking advantage of luminescent lanthanide ions, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, p. 1048.
- [13] Alpha B., Ballardini R., Balzani V., Lehn J.-M., Perathoner S., Sabbatini N., Antenna effect in luminescent lanthanide cryptates - a photophysical study, *Photochemistry and Photobiology*, **1990**, *52*, p. 299.
- [14] Mathis G., Dumont C., Jolu E.J.-P., Procédé de réduction d'interférences dans un dosage par fluorescence WO/1992/001224, **1992**.
- [15] Kennedy M.E., Wang W., Song L., Lee J., Zhang L., Wong G., Wang L., Parker E., Measuring human beta-secretase (BACE1) activity using homogeneous time-resolved fluorescence, *Anal. Biochem.*, **2003**, *319*, p. 49.
- [16] Valeur B., *Initiation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck Université, **2004**, p. 65.
- [17] Des notions sur la fluorescence sont disponibles dans *L'Act. Chim.* n° 271 (janv. **2004**), p. 36, Travaux pratiques de base pour une formation expérimentale à la fluorescence moléculaire, par M. Aubailly. Des informations complémentaires concernant la luminescence sont disponibles dans le numéro « La photochimie pour mieux vivre », n° 308-309 (mai-juin **2007**), et plus particulièrement dans l'article de B. Moine : Les luminophores pour l'éclairage fluorescent, p. 101.
- [18] Mathis G., Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera, *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, p. 1953.
- [19] Mabile M., Mathis G., Jolu E.J.-P., Pouyat D., Dumont C., Correction en temps réel par mesure du ratio pour minimiser les interférences provenant du milieu, US patent 5,527,684, **1996**.
- [20] Maurel D., Kniazeff J., Mathis G., Trinquet E., Pin J.-P., Ansanay H., Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology, *Anal. Biochem.*, **2004**, *329*, p. 253.
- [21] Maurel D., Comps-Agrar L., Brock C., Rives M.-L., Bourrier E., Akli Ayoub M., Bazin H., Tinel N., Durroux T., Prézéau L., Trinquet E., Pin J.-P., Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization, *Nature Methods*, **2008**, *5*, p. 561.
- [22] Mathis G., Socquet F., Viguier M., Darboret B., Homogeneous immunoassays using rare earth cryptates and time resolved fluorescence: principles and specific advantages for tumor markers, *Anticancer Res.*, **1997**, *17*, p. 3011.
- [23] Amendola V., Bonizzoni M., Esteban-Gomez D., Fabbrizzi L., Licchelli M., Sancenon F., Taglietti A., Some guidelines for the design of anion receptors, *Coordination Chem. Rev.*, **2006**, *250*, p. 1451.
- [24] Coldwell J.B., Felton C.E., Harding L.P., Moon R., Pope S.J., Rice C.R., Barium induced modulation of NIR emission in a neodymium cryptate complex, *Chem. Commun.*, **2006**, *48*, p. 5048.



Hervé Bazin

est expert scientifique, service recherche et développement, chez CIS bio international*.

* CIS bio international, BP 84 175, 30204 Bagnols-sur-Cèze Cedex.
Courriel : hbazin@cisbio.com
www.htrf.com