

sur des supports solides, telles des billes microscopiques de polystyrène, chimiquement inertes. Après chaque réaction, on élimine par lavage les réactifs qui n'ont pas réagi et qui restent en solution, et l'on ne conserve que les produits fixés sur les billes. Cette technique impose que l'on fixe les réactifs sur les billes, puis qu'on détache les produits de la réaction ; toutefois, la facilité de la purification compense les éventuelles difficultés posées par ces deux opérations.

Aujourd'hui, dans de nombreux laboratoires, le travail routinier de la synthèse en parallèle est automatisé : des robots déposent les réactifs dans les puits appropriés. La méthode est ainsi plus précise et moins fastidieuse. Les chercheurs de la Société *Parke-Davis* avaient construit le premier système automatisé pour la synthèse en parallèle, qui permettait l'obtention simultanée de 40 composés ; aujourd'hui, un robot de la Société *Ontogen* fabrique jusqu'à 1 000 molécules par jour. La durée d'une synthèse en parallèle dépend du nombre de composés obtenus et, en raison des limitations pratiques, on produit des banques de quelques dizaines de milliers de composés au plus par cette méthode.

La synthèse par mélange et répartition

Contrairement à la synthèse en parallèle, où chaque composé reste dans son propre puits, la synthèse par mélange et répartition brasse des produits qui se ressemblent dans un même tube à essai. On réduit ainsi le nombre de tubes à essai nécessaires tout en augmentant le nombre des produits obtenus (on peut en obtenir plusieurs millions). En contrepartie, l'identification de tous ces produits et la mesure de leur activité biologique sont très difficiles.

Supposons que trois groupes de molécules A, B et C soient respectivement composés de trois molécules (A1, A2, A3 ; B1, B2, B3 ; C1, C2, C3). Dans un récipient, on fixe les molécules A1 sur des billes de polystyrène ; dans un deuxième récipient, on place les molécules A2 et, dans le troisième, les molécules A3. On réunit alors toutes les billes portant des molécules A dans un même récipient, on les mélange, puis on divise le mélange en trois parties égales : chaque récipient contient un mélange des trois composés A. Puis on ajoute les molécules B1

dans le premier récipient, les molécules B2 dans le deuxième et les molécules B3 dans le troisième. Après avoir recommencé les mêmes manipulations et introduit les molécules C, on obtient 27 composés différents. On procède ainsi par divisions successives, car, si l'on mélangeait tous les composés en une seule fois, seuls ceux qui réagissent le plus vite se fixeraient, les autres ne réagiraient pas.

Pour isoler la molécule la plus efficace, on teste d'abord toutes les combinaisons et l'on détermine celle qui a l'activité biologique recherchée la meilleure.

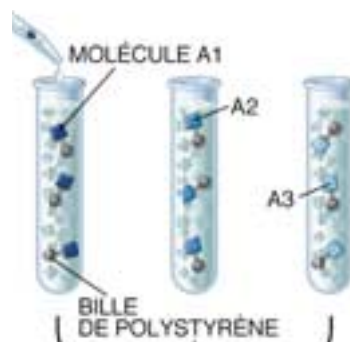
Plusieurs laboratoires pharmaceutiques ont automatisé la méthode de synthèse par mélange et répartition. L'un des premiers robots, celui de la Société *Chiron* fabrique des millions de molécules en quelques semaines : il délivre les produits chimiques et les mélange, et répartit les billes de polystyrène.

La principale difficulté de cette méthode reste l'identification d'un composé actif parmi des milliers d'autres. Kit Lam, de l'Université d'Arizona, a surmonté cet obstacle, car il a remarqué qu'à la fin d'une synthèse de ce type, toutes les molécules fixées sur une

La synthèse par mélange et répartition

Étape 1

Dans des tubes à essai, on place une suspension de billes de polystyrène inertes (les cercles gris). Pour simplifier, on n'a indiqué sur cette figure que trois tubes, mais on peut en utiliser des dizaines. On ajoute une première série de molécules – la classe A (les carrés) – dans les tubes, à raison d'un type moléculaire par tube.



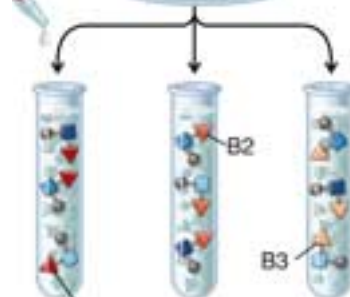
Étape 2

On regroupe le contenu des trois tubes.



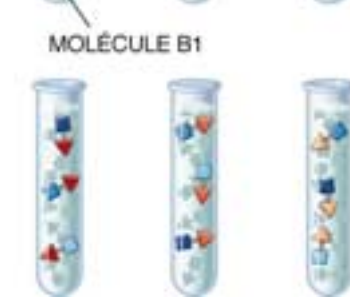
Étape 3

On partage le mélange en trois. Puis on ajoute la deuxième série de molécules – la classe B (les triangles) – en plaçant les molécules B1 dans le premier tube, les molécules B2 dans le deuxième, etc. On répète les étapes 1, 2 et 3 autant de fois que nécessaire, selon le nombre de sous-unités qui doivent être ajoutées.



Étape 4

On sépare les billes des réactifs qui n'ont pas réagi, puis on détache des billes les produits formés. Les chercheurs testent souvent l'activité biologique du mélange de chaque tube afin de déterminer l'activité biologique moyenne. Comme tous les mélanges sont identiques, au début de l'étape 3, on détermine quel est le mélange le plus actif : si c'est le tube où l'on a ajouté B2, on recommence la synthèse en ajoutant seulement des molécules B2 aux composés A. On détermine ensuite quelle est la combinaison A-B2 la plus active biologiquement.



Jared Schneidman Design

même bille sont identiques (chaque bille porte plusieurs centaines de milliards de molécules). Après avoir séparé du mélange les billes qui portent des molécules biologiquement actives, on détermine la structure moléculaire de ces composés. Malheureusement, cette méthode ne s'applique qu'à certaines molécules, notamment aux peptides et aux fragments d'ADN pour lesquels on sait déterminer la séquence sur des quantités infimes (par PCR, ou méthode d'amplification des gènes).

D'autres chercheurs ont une autre méthode, qui consiste à placer sur chaque bille une molécule connue, ou étiquette chimique, en même temps qu'une sous-unité réactive (on associe à chaque sous-unité une étiquette spécifique). En fin de réaction, on décroche les étiquettes, et leur identi-

fication, par une méthode chromatographique, par exemple, permet de reconstruire la formule chimique de la molécule synthétisée, sans avoir à identifier ses sous-unités. Néanmoins, l'identification des composés obtenus par la méthode de synthèse par mélange et répartition est généralement si difficile que la plupart des laboratoires pharmaceutiques utilisent la méthode de synthèse en parallèle.

Des banques de médicaments

Les deux techniques de la chimie combinatoire ont été initialement conçues pour la fabrication de peptides. Importantes dans les systèmes biologiques, ces molécules sont de médiocres médicaments, car elles sont

dégradées dans le tube digestif, mal absorbées par la paroi de l'estomac et rapidement éliminées.

L'industrie pharmaceutique a continué avec acharnement à améliorer les méthodes combinatoires quand elle a compris qu'elle pouvait aussi les appliquer à des analogues de certains médicaments, les benzodiazépines notamment.

Ces médicaments sont parmi les plus prescrits. Le plus connu est le diazépam, ou Valium, mais beaucoup d'entre eux ont une importante activité biologique ; on trouve ainsi des agents anticonvulsifs et antihypnotiques, des antagonistes du facteur d'activation des plaquettes (une molécule essentielle à la coagulation du sang), des inhibiteurs de l'enzyme transcriptase inverse du VIH ou des inhibiteurs de la Ras farnésyle transférase, une enzyme qui participe au développement des cancers. En raison de la diversité de leur activité biologique, les benzodiazépines ont été les premiers composés non peptidiques préparés par synthèse combinatoire, dans l'espoir de trouver de nouveaux médicaments. En 1992, l'un d'entre nous (J. Ellman) a mis au point une méthode de synthèse des benzodiazépines sur support solide, ce qui a permis la constitution de banques contenant des milliers de dérivés des benzodiazépines.

Plus récemment, nous avons amélioré la synthèse des benzodiazépines sur support solide et avons obtenu un nombre de nouveaux composés encore supérieur. Dans les synthèses combinatoires, on doit minimiser les réactions secondaires qui produisent des impuretés. Nous avons ainsi passé plus d'un an à perfectionner les conditions de notre nouvelle synthèse des benzodiazépines, mais, une fois les conditions optimales précisées, nous avons mis deux mois seulement pour fabriquer 11 200 composés !

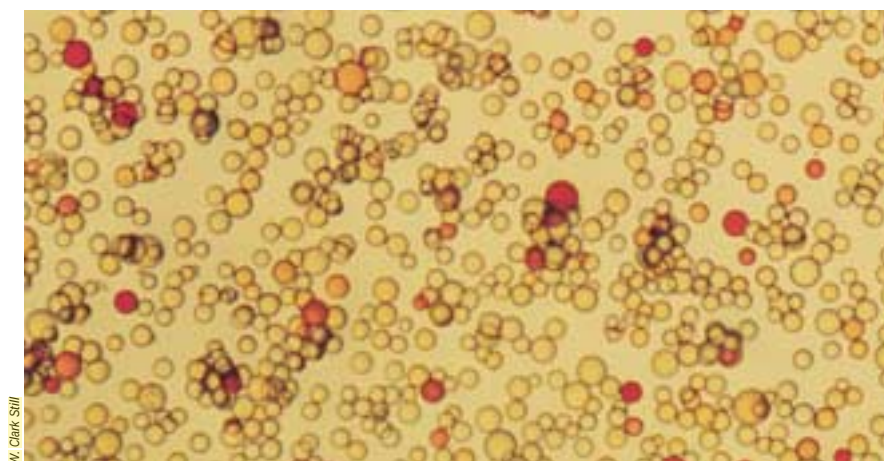
Plusieurs de ces molécules ont une activité biologique prometteuse. L'une d'entre elles inhibe une enzyme qui intervient dans le cancer du côlon et dans l'ostéoporose ; une autre bloque l'interaction de certains anticorps et de l'ADN simple brin (une telle interaction est souvent incriminée dans une maladie auto-immune, le lupus érythémateux). Pour le moment, ces composés sont en cours d'évaluation en laboratoire.

Lorsque l'industrie pharmaceutique a vu que la chimie combinatoire



Charles O'Rear

2. CE ROBOT DE CRIBLAGE transporte automatiquement des plaques, où sont fixées des banques combinatoires, jusqu'à l'appareil qui teste leur activité biologique.



W. Clark Still

3. DES BILLES DE POLYSTYRÈNE (agrandies environ 100 fois) sont souvent utilisées en chimie combinatoire : elles retiennent les produits de réaction, de sorte qu'un lavage élimine les molécules qui n'ont pas réagi. Les billes qui deviennent rouges sont celles qui ont une forte affinité pour un récepteur stéroïdien de synthèse.