

La synthèse combinatoire

DANIEL MICHELET • CLAUDE HÉLÈNE

La chimie combinatoire donne rapidement toutes les combinaisons possibles d'un jeu de molécules. La diversité de ces molécules aide le chimiste à découvrir de nouvelles substances thérapeutiques.

Les pharmacologues sont sans cesse en quête de nouveaux médicaments. Leur tactique de recherche a évolué au fil du temps, les différentes stratégies étant souvent complémentaires : recherche systématique d'une éventuelle activité biologique parmi les molécules synthétisées dans un laboratoire ; collecte de substances naturelles ; conception assistée par ordinateur de molécules. Aujourd'hui, la chimie combinatoire autorise la synthèse de collections, ou banques, de molécules par combinaison d'un jeu de molécules de construction. Ce faisant, les chimistes ne font qu'imiter la nature qui, partant de quelques molécules élémentaires, a construit toute la variété des gènes et des protéines.

Au cours des années 1970, les progrès du génie génétique ont permis aux biologistes de préparer des quantités notables de protéines pures : pour ce faire, ils introduisent le gène codant la protéine recherchée dans le génome d'une bactérie, laquelle synthétise cette molécule comme s'il s'agissait d'une de ses propres protéines. Certaines, telles que l'insuline ou des facteurs de croissance, sont des médicaments. D'autres sont des cibles thérapeutiques : en inhibant, partiellement ou totalement, leur activité biologique, on peut maîtriser les mécanismes biologiques auxquels elles participent.

Les biochimistes ont ensuite mis au point des tests colorimétriques leur permettant d'évaluer l'affinité d'une molécule pour une protéine cible et de ne conserver ainsi, dans une collection, que les molécules présentant un intérêt pharmacologique potentiel. Ces tests permettent de « cribler » plusieurs dizaines de milliers de molécules par mois, mais les sociétés qui les avaient élaborés n'avaient pas de collections de molécules à tester !

Une nouvelle méthode de synthèse allait pallier cette insuffisance. Au cours des années 1980, les immuno-chimistes cherchaient à établir la structure des fragments des protéines virales (ou peptides viraux) qui déclenchent les réactions du système immunitaire d'un organisme infecté par un virus. Pour synthétiser de nombreux peptides de 5 à 12 acides aminés, ils ont mis au point une nouvelle méthode, nommée synthèse en parallèle. Les peptides produits par ces synthèses en parallèle ont permis aux immunologistes d'identifier de nombreux sites de liaison entre les anticorps et les protéines virales.

La méthode combinatoire est dérivée de cette synthèse de peptides en parallèle, mais elle est plus puissante, car elle produit un nombre de molécules croissant exponentiellement à chaque étape de la synthèse (dans la synthèse en parallèle, on obtient un nombre constant de peptides à chaque étape). Le principe de ce mode de synthèse divergent est illustré dans l'encadré de la page ci-contre.

De la synthèse à l'identification

Ainsi, au lieu de n'engager qu'un seul acide aminé à chaque stade de la synthèse, on fait réagir simultanément les 20 acides aminés naturels : on obtient alors, en n étapes, 20^n peptides représentant toutes les combinaisons possibles de ces 20 acides aminés en molécules ordonnées de n éléments. En pratique, la méthode de synthèse en parallèle divergente ne donne pas la diversité moléculaire escomptée, car les acides aminés en concurrence ne réagissent pas avec la même vitesse, de sorte que de nombreux peptides sont peu abondants, voire absents. D'autres méthodes donnant effectivement des

quantités équivalentes de toutes les combinaisons possibles de peptides ont été mises au point : la méthode de synthèse par répartition et mélange, et la synthèse contrôlée par la lumière.

Dans la méthode par répartition et mélange, la synthèse a lieu sur un support solide constitué de billes de polystyrène. Placées dans un solvant, elles gonflent, de sorte que l'intérieur devient accessible aux réactifs dissous. Chaque bille porte environ 10^{13} amorces qui se combinent avec les réactifs. Par réactions successives, on obtient des oligomères, des molécules constituées d'un enchaînement de plusieurs sous-unités. Dans le cas où les molécules de construction sont des acides aminés, on obtient des oligopeptides.

Quand on dispose de n molécules de construction, et que l'on réalise p étapes de condensation (voir l'encadré de la page ci-contre), on produit n^p molécules, chaque bille portant 10^{13} copies d'un seul type de molécules.

Comment identifie-t-on les billes qui portent des molécules actives ? En fin de réaction, les billes sont réparties dans des « puits » creusés dans une plaque, et une partie des peptides qu'elles portent sont libérés. Ces molécules sont alors solubilisées dans le liquide contenu dans le puits, et un test colorimétrique indique l'affinité d'une des molécules synthétisées pour une protéine cible. Quand un des puits se colore, cela signifie qu'une des billes porte une molécule intéressante. Les billes de ce puits sont réparties une par une sur une nouvelle plaque et le test colorimétrique indique quelle bille porte la molécule active. On la caractérise alors par diverses méthodes physico-chimiques.

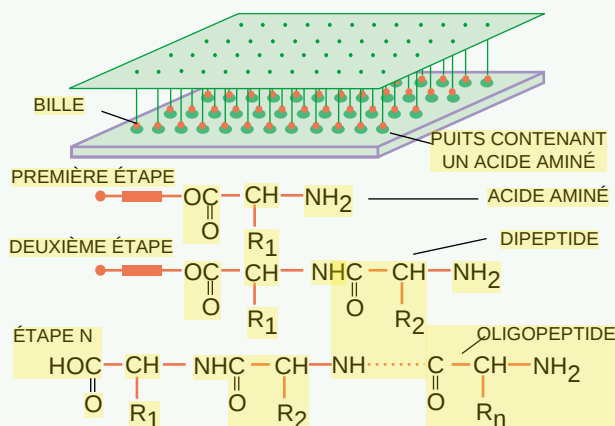
La deuxième méthode, la synthèse dirigée par la lumière, se déroule également sur support solide, sur un plan. Les acides aminés greffés sur la sur-

La synthèse en parallèle

Dans la synthèse en parallèle, une petite bille de polystyrène est fixée à une tige de polyéthylène ou «pin». Chacun des puits de la plaque contient un seul acide aminé.

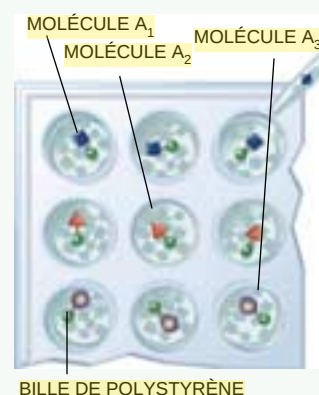
On plonge tous les pins dans les puits, et l'acide aminé présent dans chaque puits se greffe sur la bille immergée, par l'intermédiaire d'un «bras» (le cylindre rouge). Puis on change les acides aminés contenus dans les puits, et les billes sont à nouveau immergées. Le nouvel acide aminé se lie au premier, formant un dipeptide. Après n étapes, on obtient un oligopeptide qui est libéré dans le puits après rupture du bras qui le reliait à la bille de polystyrène.

Par cette méthode, on obtient autant de peptides différents qu'il y a de puits, et ces molécules sont formées par la succession des acides aminés qui ont été successivement introduits dans les puits.



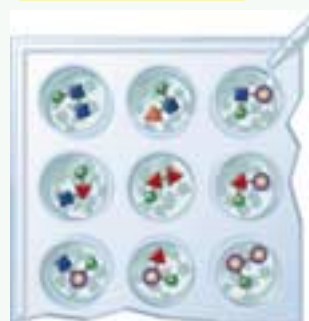
Les différentes méthodes de synthèse des banques combinatoires

La synthèse en parallèle divergente



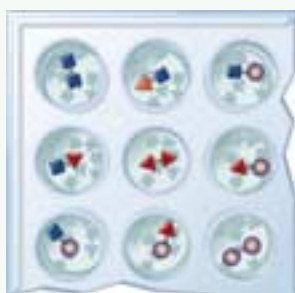
Étape 1

On dispose d'un jeu de trois molécules A₁, A₂, A₃. Ces molécules sont fixées sur des billes de polystyrène différentes.



Étape 2

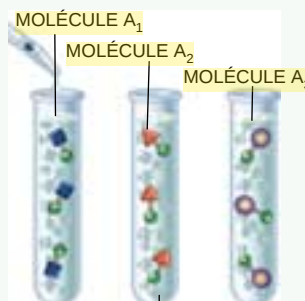
On ajoute dans chacun des puits le mélange des trois molécules A₁, A₂, A₃. On obtient les molécules A₁A₁, A₁A₂, A₁A₃; A₂A₁, A₂A₂, A₂A₃; A₃A₁, A₃A₂, A₃A₃ (pour simplifier, on n'a représenté qu'un type de molécules par puits, mais, en réalité, les trois types de molécules sont mélangés, sur chaque ligne).



Étapes suivantes

Au bout de deux étapes, on a synthétisé 3², soit neuf molécules différentes (en recommençant n fois la même opération, on obtient 3ⁿ molécules). Toutefois, les billes portent toutes un mélange de molécules, ce qui rend l'identification de la molécule active difficile.

La synthèse par répartition et mélange



Étape 1

Des billes de polystyrène sont introduites dans les tubes à essai. Les molécules A₁ sont placées dans le premier tube, les molécules A₂ dans le deuxième, etc. On n'a représenté que trois tubes, mais on peut en utiliser des dizaines.

Étape 2

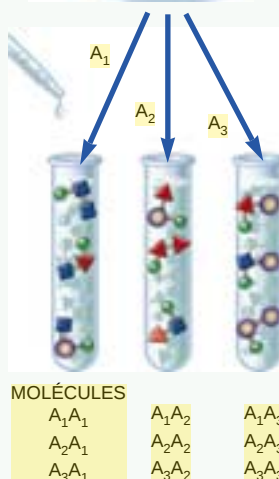
Le contenu des tubes est filtré et rincé, et toutes les billes sont regroupées et mélangées.

Étape 3

Le mélange est partagé en trois, et des molécules A₁ sont introduites dans le tube 1, des molécules A₂ dans le tube 2, etc.

Étapes suivantes

On recommence les opérations de mélange et de partage autant de fois qu'il est nécessaire pour ajouter toutes les sous-unités voulues. Une bille ne porte qu'un seul type de molécules, car, à chaque étape, les billes ne sont en contact qu'avec un seul réactif. Un test colorimétrique identifie la bille qui porte la molécule active.



face plane portent un groupe protecteur sensible à la lumière qui les empêche de réagir. La lumière coupe les groupes protecteurs de sorte que seuls les peptides situés dans les zones éclairées se couplent à l'acide aminé présent dans la solution où est plongé le plan. En utilisant les stratégies de masquage de la photolithographie, on synthétise 2^n peptides avec n masques en n étapes de synthèse. La société californienne *Affymax*, qui a mis au point cette méthode, a obtenu 2^{16} (soit 65 536) peptides différents sur une surface de moins de deux centimètres carrés.

On localise les peptides potentiellement intéressants en détectant ceux qui se lient à la cible biologique voulue, par exemple grâce à des anticorps fluorescents. Comme on connaît la suite des acides aminés que l'on a ajoutés et que l'on a enregistré la position des masques, on déduit la composition des peptides de leur position sur le plan.

Les molécules de la synthèse combinatoire

La chimie combinatoire a d'abord servi à la synthèse de peptides à partir d'acides aminés naturels, puis, par le même procédé, des banques de peptides ont été préparées à partir d'autres acides aminés (artificiels), dont on espérait qu'ils résisteraient à l'action des protéases, les enzymes qui dégradent les protéines. Des pseudopeptides, nommés peptoides, ont ainsi été préparés. Les chimistes ont également synthétisé des banques combinatoires d'oligonucléotides. On synthétise un

mélange d'oligonucléotides (des fragments d'ADN) ; ces molécules sont composées de deux séquences fixes (les deux extrémités constituées d'une quinzaine de nucléotides) et d'une séquence centrale aléatoire de n nucléotides. Pour cette synthèse, on utilise les quatre nucléotides naturels (les constituants de l'ADN), de sorte que le mélange contient 4^n molécules.

Différentes techniques permettent de séparer, dans ce mélange, les molécules qui se fixent sur une cible choisie ; ensuite, on les amplifie par la méthode d'amplification des gènes, nommée PCR, qui a joué un rôle déterminant dans la sélection et l'identification d'oligonucléotides reconnaissant une cible biologique donnée. On recommence plusieurs fois le cycle de séparation et d'amplification, avant de séquencer les molécules intéressantes. C'est ainsi qu'ont été sélectionnés des oligonucléotides courts qui inhibent la thrombine, l'une des enzymes de la cascade de la coagulation du sang. Dans l'organisme, cette enzyme ne se fixe pourtant pas sur des acides nucléiques.

Les oligonucléotides ont la propriété de se replier en formant des «cages» qui ressemblent aux sites actifs des enzymes. Les molécules cibles s'y logent de façon très spécifique : par exemple, un oligonucléotide sélectionné pour fixer la théophylline (la principale substance stimulante contenue dans les feuilles de thé) reconnaît 10 000 fois moins bien la caféine, qui ne diffère de la théophylline que par un seul groupe méthyle (CH_3).

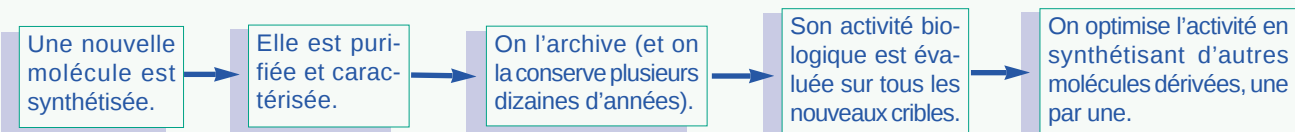
Dans tous les cas énoncés jusqu'à présent, la diversité moléculaire a été

obtenue par la synthèse de toutes les combinaisons possibles d'éléments de construction bifonctionnels (portant une fonction acide et une fonction amine dans le cas des peptides, et deux fonctions alcool reliées par des groupes phosphate dans le cas des oligonucléotides) dans un oligomère linéaire. Une autre façon de créer des banques de molécules intéressantes consiste à «décorer» un «répartiteur de fonctions chimiques» par les méthodes combinatoires.

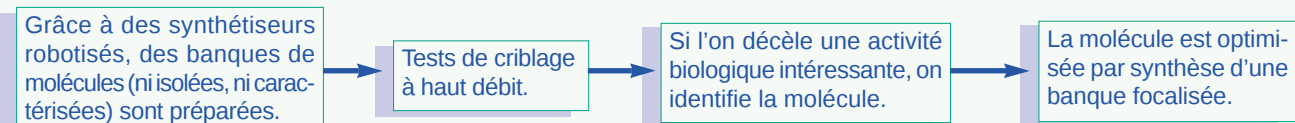
Considérons, par exemple, un cycle portant trois fonctions $-\text{COOH}$, protégées par des groupes qui les empêchent de réagir. Quand on élimine le groupe protecteur d'une fonction $-\text{COOH}$, on peut la combiner avec 20 amines différentes ; on obtient 20 amides $-\text{CO}-\text{NHR}_n$, où n prend les valeurs de 1 à 20. En éliminant ensuite les deux autres groupes protecteurs, on obtient 8 000 ($= 20^3$) triamides (des molécules portant trois fonctions amide, $-\text{CO}-\text{NH}-$). Sachant que quelque 5 000 acides et plus de 3 000 amines sont commercialisés, et que le nombre de fonctions portées par les répartiteurs varie quasi «à volonté», on conçoit la diversité des molécules ainsi obtenues. Outre leur diversité, ces molécules, en forme d'étoiles, sont de meilleurs produits pharmaceutiques potentiels que les peptides ou les oligonucléotides : elles ont, généralement, une meilleure biodisponibilité (leur concentration dans les organes cibles est supérieure à celle des peptides, car elles ne sont pas reconnues par les enzymes qui dégradent les protéines).

De la chimie classique à la chimie combinatoire

Chimie classique



Chimie combinatoire



Dans la méthode «classique», on consacre beaucoup de temps à synthétiser et à caractériser des molécules, sans savoir si elles auront les propriétés recher-

chées. Au contraire, dans la méthode combinatoire, on ne s'intéresse qu'aux molécules dont on sait déjà qu'elles ont les propriétés recherchées.