

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

Une nouvelle molécule est synthétisée.

Elle est purifiée et caractérisée.

On l'archive (et on la conserve plusieurs dizaines d'années).

Son activité biologique est évaluée sur tous les nouveaux cribles.

On optimise l'activité en synthétisant d'autres molécules dérivées, une par une.

Chimie combinatoire

Grâce à des synthétiseurs robotisés, des banques de molécules (ni isolées, ni caractérisées) sont préparées.

Tests de criblage à haut débit.

Si l'on décèle une activité biologique intéressante, on identifie la molécule.

La molécule est optimisée par synthèse d'une banque focalisée.

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.

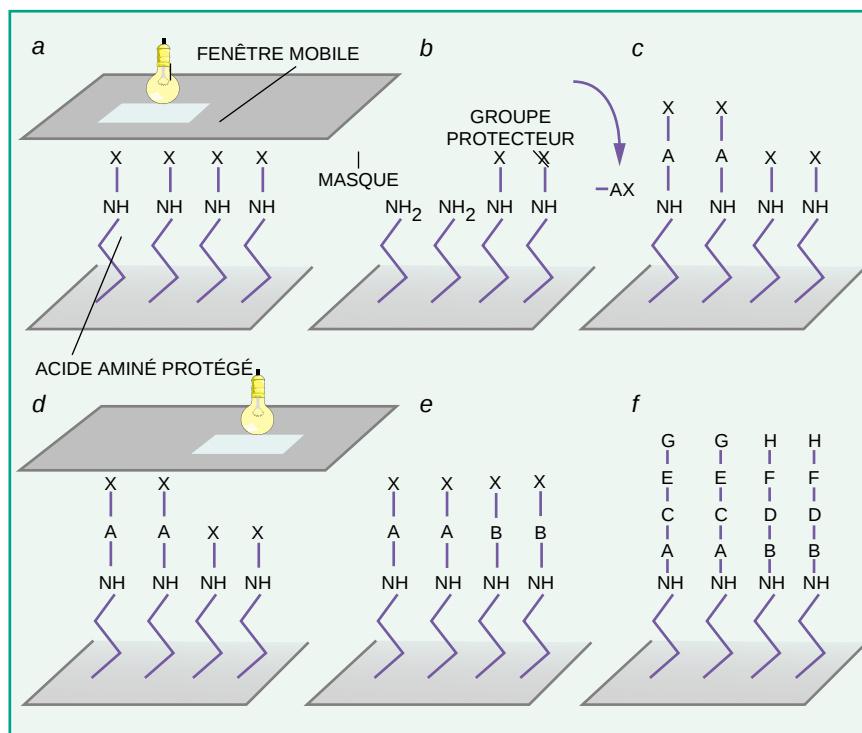
Toutefois, les chimistes rêvent de réaliser, grâce à la chimie combinatoire, des banques de molécules fondées sur l'établissement de liaisons carbone-carbone, et non pas seulement sur des liaisons amides ($-\text{CO}-\text{NH}-$). En fait, les chimistes ont synthétisé facilement des banques combinatoires de peptides et d'oligonucléotides parce qu'ils maîtrisaient si bien les couplages entre les éléments constitutifs qu'ils ont réussi à faire des synthèses multi-étapes sur support solide sans avoir à purifier les produits intermédiaires de synthèse. Les produits obtenus, en fin de réaction, sont même parfois utilisés sans être purifiés, ni caractérisés.

Le caractère univoque de ces synthèses a permis de s'abstraire de ce qui fait habituellement l'essentiel du travail du chimiste : la purification, l'isolement et la caractérisation, opérations artisanales qui doivent être réalisées molécule par molécule. Cette économie d'opérations fastidieuses confère à la chimie combinatoire son attrait. La synthèse se réduit à des opérations de mélange et d'agitation praticables en parallèle et à grande échelle par des robots. Toutefois, on ne pourra créer des banques combinatoires fondées sur d'autres réactions, et notamment sur la création de liaisons carbone-carbone, que si les réactions mises en jeu sont sélectives et si les rendements sont satisfaisants.

La généralisation de la synthèse combinatoire pose donc – enfin ! – des problèmes de chimie aux chimistes : trouver des conditions de synthèse telles que le rendement soit supérieur à 95 pour cent, quelles que soient les molécules qui réagissent.

Support solide ou solution homogène?

Dans la synthèse sur support solide, la molécule en cours de synthèse est portée par une bille, ce qui permet de la séparer très simplement par filtration. Dans le cas des peptides et des oligonucléotides, 20 ans d'optimisation de la synthèse sur support solide ont précédé l'apparition de la chimie combinatoire : on dispose d'un arsenal de réactifs et de conditions opératoires qui permettent de réaliser des synthèses sur support solide avec un excellent rendement, quelle que soit la séquence synthétisée. Parce qu'ils espèrent synthétiser par la chimie combinatoire d'autres structures que des peptides ou



1. LA SYNTHÈSE COMBINATOIRE DIRIGÉE PAR LA LUMIÈRE est une autre méthode destinée à la préparation de banques combinatoires. Dans une première étape (a), tous les peptides greffés sur un support de silice sont protégés par un groupe X. L'ouverture est mise en place, et la lumière, qui pénètre uniquement par ce trou, libère les groupes protecteurs (b). On ajoute alors la brique de construction AX, qui ne peut réagir qu'avec les groupes non protégés (c). On déplace la fenêtre (d) et l'on ajoute le réactif BX. Seules quelques chaînes (dont on connaît la position) réagissent (e). En procédant de proche en proche, on fabrique des oligopeptides dont l'ordinateur a enregistré la séquence et la position sur la plaque (f).

des oligonucléotides, les chimistes tentent, aujourd'hui, sur support solide, des synthèses qui jusqu'à présent étaient réalisées dans des solvants. Cette «reconversion» n'est pas aisée.

D'où viennent les difficultés? Même si les billes de polystyrène faiblement réticulées gonflent dans le solvant pour donner une sorte de gel, ce qui permet aux réactifs de rencontrer les molécules attachées au polystyrène, le milieu n'est pas identique à une solution, et les rendements sont inférieurs.

Des progrès ont déjà été obtenus : les chimistes ont modifié les billes de polystyrène en y greffant notamment des chaînes de polyéthylène glycol, ce qui les rend compatibles avec un plus grand nombre de solvants. Ils mettront certainement au point des supports solides encore mieux adaptés, leur permettant de transposer plus facilement sur support solide les synthèses connues en solution homogène.

Une autre solution consiste à échapper au support solide. Ainsi, des supports à solubilité conditionnelle sont utilisés : le premier élément de la molécule à synthétiser est fixé à l'extré-

mité d'une molécule de polyéthylène glycol grâce à un bras clivable. Le polyéthylène glycol est soluble dans la plupart des solvants ; on peut ainsi réaliser la première étape de la synthèse dans le solvant utilisé normalement pour cette synthèse. En revanche, le polyéthylène glycol est quasi insoluble dans l'éther. On le fait précipiter avec la petite molécule qu'il porte, en ajoutant de l'éther, puis, après filtration, les autres étapes de la synthèse se poursuivent sur le même principe.

Une autre méthode encore consiste à faire des réactions à plusieurs composants, lesquelles permettent aussi d'échapper à la synthèse sur support solide : plusieurs molécules sont amenées à réagir simultanément et donnent une seule molécule (voir la figure 2). L'ensemble des combinaisons possibles à partir des molécules de départ, ou synthons, présente une diversité moléculaire notable. Toutefois, on connaît peu de réactions de ce type, mais étant donné leur potentiel en synthèse combinatoire, les chimistes recherchent de nouvelles réactions multicomposants.