

Contribution de la spectrométrie de masse au développement de la chimie combinatoire

Pierre-Hervé Lambert* docteur, **Sophie Bertin*** docteur, **Jean-Paul Volland*** ingénieur chimiste

Summary : *Contribution of mass spectrometry to the development of combinatorial chemistry*

In the field of the search for biological active compounds, the development of high throughput screening techniques, combinatorial chemistry and parallel synthesis have caused the need for efficient analytical methods able to handle complex mixtures or large numbers of compounds. In this article, various mass spectrometric technics allowing the analysis of libraries or collections of compounds will be discussed. New high throughput technologies like high-density sampling MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) targets, coupling of parallel liquid chromatography and mass spectrometry, and new developments of mass spectrometry-based preparative chromatography, isotopic encoding and biological screening will be reported.

Mots-clés : *Spectrométrie de masse, chimie combinatoire, bibliothèques, collections, haut débit.*

Key-words : *Mass spectrometry, combinatorial chemistry, libraries, collections, high-throughput.*

Durant la dernière décennie, les développements de la spectrométrie de masse (nouvelles méthodes d'ionisation douce, couplage avec la chromatographie en phase liquide, etc.) ont permis les progrès de chimies non conventionnelles comme la chimie combinatoire [1-3]. Selon les différentes stratégies retenues pour découvrir une molécule biologiquement active, le problème de l'identification moléculaire peut être posé de manière extrêmement variée. En effet, sous le vocable « chimie combinatoire », on distingue en réalité des problématiques très différentes : la nature même de l'échantillon peut être, soit un mélange, dénommé **bibliothèque**, d'un nombre plus ou moins grand de molécules obtenues par chimie combinatoire proprement dite (de quelques unités à plusieurs milliers d'exemplaires), soit, au contraire, un nombre tout aussi variable de molécules isolées obtenues par synthèse parallèle et l'on parlera alors de **collection** de produits. Ces principes ne seront pas revus ici, mais l'importance de la spectrométrie

de masse dans ce type de recherche y sera soulignée.

Analyse de bibliothèques obtenues par synthèse combinatoire

Quelle que soit la stratégie choisie (déconvolution itérative, « positional scanning », etc.), une bibliothèque se compose d'un mélange plus ou moins complexe de molécules dont les structures possèdent une partie commune. Sur celles-ci sont greffés des substituants pris parmi différents ensembles, afin de synthétiser, par un jeu de synthèse combinatoire, le plus grand nombre de combinaisons possibles de molécules, le but étant de recouvrir une certaine diversité moléculaire. Les problèmes posés à l'analyste sont de différents ordres :

- contrôler la présence de chaque molécule attendue,
- estimer leur équimolarité,
- identifier les possibles produits secondaires.

Pour ce faire, le choix des techniques de spectrométrie de masse va dépendre essentiellement du nombre de composants de la bibliothèque ainsi que de sa dégénérescence, c'est-à-dire de la frac-

tion de molécules possédant la même masse moléculaire par rapport au nombre total de molécules.

Analyse de bibliothèques par spectrométrie de masse basse résolution

Considérons une bibliothèque de tétra-peptides du type O1X2X3X4 synthétisée selon la méthode « mix and split » en vue d'une déconvolution itérative et pour laquelle X sera choisi parmi 20 acides aminés : cette bibliothèque est composée de 20^3 soit 8 000 peptides de nature différente. Étant donné qu'il est illusoire de tenter de séparer efficacement un tel nombre de composés, l'analyse la plus rapide est de comparer par spectrométrie de masse la distribution expérimentale des intensités des molécules protonées en fonction de leur rapport masse/charge avec la distribution théorique calculée. Le choix de la méthode d'ionisation sera donc limité à une méthode d'ionisation douce supposée conduire à un ion unique par molécule. Parmi celles-ci, l'électrospray (ESI : electrospray ionization), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : atmospheric pressure chemical ionization) ou la désorption laser assistée par matrice (MALDI : matrix-assis-

* Institut de Recherches Servier, division de Physico-chimie analytique, 11, rue des Moulineaux, 92150 Suresnes.
Tél. : 01.55.72.22.68. Fax : 01.55.72.23.80.
E-mail : libpca@francenet.fr

ted laser desorption ionization) sont généralement employées. Cependant, la précision d'une telle analyse reste limitée. En effet, ces méthodes d'ionisation ne conduisent pas nécessairement à un ion unique, par exemple de type $[M+H]^+$ en mode positif, mais aussi, éventuellement, à des ions multichargés $[M+nH]^{n+}$, des ions adduits $[M+H+\text{solvant}]^+$, voire à des ions-fragments, selon des abondances qu'il est difficile de prévoir. L'équimolarité est à l'évidence délicate à estimer d'autant que les rendements d'ionisation de chacun des constituants peuvent varier d'un ordre de grandeur en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules. Un certain bruit de fond chimique, dû à la matrice ou aux solvants utilisés, peut aussi ne pas être négligeable. La *figure 1* montre cependant qu'une librairie incomplètement synthétisée peut être mise en évidence par cette simple approche.

Analyse de librairies par spectrométrie de masse haute résolution

Afin d'améliorer la spécificité de telles analyses, l'augmentation

de la résolution, en séparant des ions de même masse nominale mais de compositions élémentaires différentes, peut être envisagée. Cependant, lorsque la dégénérescence de la librairie augmente, la résolution nécessaire pour séparer la plupart des ions devient vite hors de portée des spectromètres de masse les plus résolutifs. Il a été calculé [4] qu'une résolution procurant une précision de 5 ppm est nécessaire pour lever la dégénérescence d'une librairie non peptidique composée de seulement 12×96 composés. Pour une librairie peptidique de $12 \times 16 \times 9$ composés, pour laquelle on s'attend à une dégénérescence supérieure, une telle haute résolution ne permettrait l'identification que de 33 % de ses constituants. Lorsque l'on met en rapport le coût et éventuellement la difficulté de mise en œuvre de la haute résolution, le bénéfice de celle-ci ne paraît évident que pour des librairies de taille limitée à quelques dizaines de composés. Une façon de contourner cette difficulté est alors de construire des librairies non dégénérées. Hughes [5] propose un certain nombre de règles permettant d'en élaborer.

Analyse de librairies par couplage spectrométrie de masse/spectrométrie de masse (MS/MS : mass spectrometry/mass spectrometry)

La spectrométrie de masse en tandem MS/MS ne peut être envisagée que pour rechercher plus ou moins spécifiquement dans des mélanges des familles de composés dont on suppose qu'une partie commune de la structure induirait une réaction prévisible et générale après ionisation en phase gazeuse. L'efficacité de certains modes de balayage MS/MS permet de détecter spécifiquement certains peptides incomplètement déprotégés. Ainsi, des peptides protégés par des groupements *tert*-butyloxy et Pmc (2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl) sont détectés par des pertes de neutres de 56 et de 309 Da, tandis que des peptides encore tritylés peuvent l'être par des balayages sélectionnant les ions précurseurs du cation triphénylméthylum [6]. Les familles particulières de peptides de type O1O2-Arg-X4 peuvent aussi être détectées par MS/MS dans des librairies de type O1O2X3X4 de 24×24 tétrapeptides [7].

Analyse de librairies par couplage chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse (LC/MS : liquid chromatography/mass spectrometry)

Bien entendu, les techniques de couplage chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse sont les plus adaptées à l'analyse de librairies à la condition qu'elles soient de taille modérée. L'acquisition simultanée du signal d'un détecteur de chromatographie en phase liquide et des spectres de masse apporte une information supplémentaire sur l'équimolarité de la librairie. Avec la spectrométrie de masse, il est possible, même lorsque de nombreux composés coéluent, de dénombrer le nombre de composés possédant une masse moléculaire donnée par le biais de courants ioniques reconstitués. Pour de très grandes librairies, les problèmes de coélution et de sensibilité rendent cette méthode inexploitable. Cependant, une image partielle de la librairie peut être obtenue par le mode d'acquisition d'ions

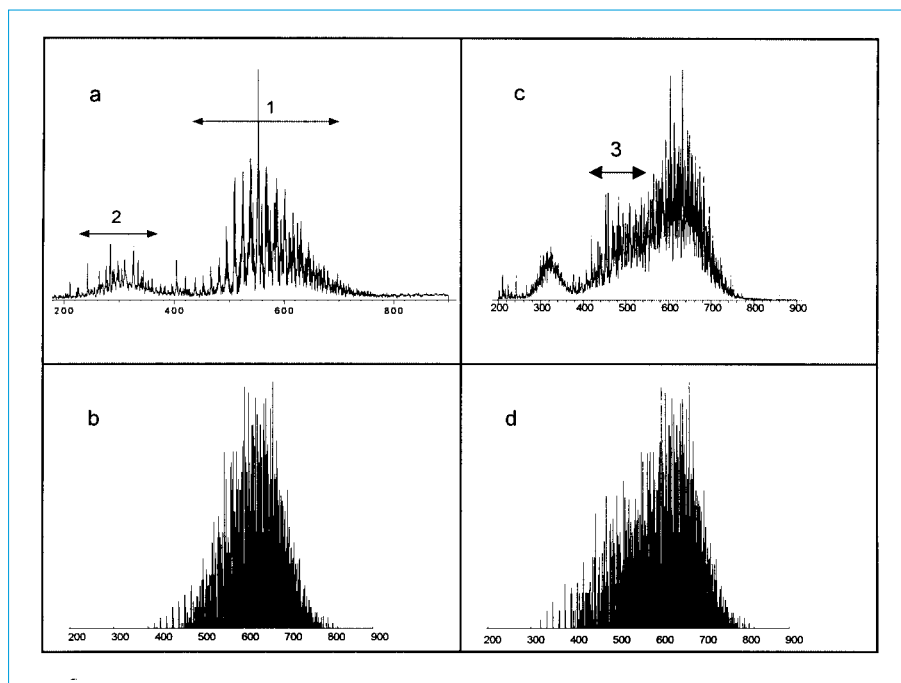


Figure 1 - librairie Nip-X2X3X4-NH2 (Nip : 4-nitrophénylalanine).

a : spectre de masse ESI montrant les tétrapeptides protonés (zone 1) et doublement protonés (zone 2).

b : distribution théorique pour une librairie complète et équimolaire de tétrapeptides.

c : spectre de masse ESI d'une librairie incomplètement synthétisée. La zone 3 est révélatrice de la présence de tripeptides protonés.

d : distribution théorique des peptides protonés en supposant que l'étape de couplage de X2 ne s'est réalisée qu'avec un rendement de 20 %.

sélectionnés SIM (selected ion monitoring) où un (ou quelques) ion(s) de rapport m/z prédéfini(s) sont seulement détecté(s). Il a ainsi été montré [8] que la sensibilité de cette approche est suffisante pour détecter un peptide connu pour être le seul possédant une masse moléculaire donnée parmi 24^3 soit 13 824 autres peptides dans une librairie de type O1X2X3X4.

Analyse à haut débit de collections obtenues par synthèse parallèle

Les problèmes posés par l'analyse de collections diffèrent notablement de ceux posés par l'analyse de librairies puisque cette fois-ci, c'est le nombre, et non la complexité des échantillons, qui est en cause. Pour résoudre ce problème, l'ensemble des étapes de l'analyse, c'est-à-dire, la préparation des échantillons, leur introduction, leur analyse proprement dite ainsi que l'exploitation et la sortie des résultats, doit pouvoir être automatisé efficacement.

Analyse de collections par injections en boucle (FIA : flow injection analysis)

Un des intérêts des méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, ESI ou APCI, est qu'elles nécessitent l'introduction des échantillons en solution. De ce fait, la robotique existante pour des systèmes HPLC (high performance liquid chromatography), comme les préparateurs-injecteurs d'échantillons, est directement compatible avec des spectromètres équipés de ce type de source d'ionisation. Le nombre d'échantillons analysables par unité de temps n'est limité que par le cycle d'injection et par d'éventuels effets mémoire. Si l'information sur la masse moléculaire est seulement souhaitée, des cadences d'un échantillon par 0,5 à 2 minutes sont possibles. Par l'utilisation de vannes d'injection à entrées multiples, huit échantillons peuvent être introduits dans le flux de solvant en une seule injection. L'analyse totale d'une plaque de 96 puits est réalisée en seulement 12 minutes [9]. Les spectromètres de masse récents de type MS/MS sont aujourd'hui capables de reconnaître à chaque

balayage les ions les plus abondants et, convenablement programmés, d'entreprendre successivement l'enregistrement de leurs spectres d'ions-fragments produits par collision, apportant ainsi une information structurale complémentaire. D'autre part, l'avènement de spectromètres de masse à analyseur à temps de vol (TOF : time of flight), équipés de systèmes d'extraction d'ions retardée et de miroirs électrostatiques rend possible, par leur pouvoir résolutif, la détermination des compositions élémentaires de ces ions de façon routinière.

La principale limitation des systèmes d'analyse par FIA reste le fait que l'ion le plus abondant peut ne pas correspondre à l'espèce la plus abondante. En effet, lors de l'ionisation, des phénomènes de compétitivité, communément dénommés « effets de suppression », peuvent être responsables de la surreprésentation d'une espèce minoritaire par rapport à l'espèce principale. Ce problème est particulièrement aigu lorsqu'on travaille avec un échantillon provenant d'une bille unique (typiquement quelques dizaines de picomoles) et pouvant contenir, par exemple, un solvant comme le diméthyl sulfoxyde qui produit un effet de suppression puissant. Un mode d'introduction plus sophistiqué faisant intervenir après lavage à l'eau une élution sur une microcolonne capillaire résout ce type de difficulté [10].

Analyse de collections par couplage chromatographie en phase liquide/ spectrométrie de masse

Malgré une mise en œuvre plus délicate et certaines limitations, les avantages de la LC/MS comparés à

l'injection en boucle paraissent évidents :

- raréfaction ou disparition d'effets de suppression évoqués plus haut,
- possibilité, par l'adjonction d'un deuxième type de détecteur, de disposer d'un critère de pureté qui peut être indispensable pour valider les résultats pharmacologiques.

En HPLC, par l'utilisation de nouvelles colonnes plus courtes à granulométrie plus faible, de gradients rapides, les analystes ont cherché un compromis entre la vitesse d'analyse, et une certaine préservation de la résolution chromatographique. Des cycles d'analyses inférieurs à 10 minutes sont couramment utilisés. Un gain de temps supplémentaire est réalisé par l'utilisation de systèmes utilisant deux colonnes en parallèle, l'une fonctionnant en mode analytique tandis que l'autre est rééquilibrée. L'emploi de chromatographie liquide supercritique couplée à la spectrométrie de masse SFC/MS permet de réduire ces cycles à 1 ou 2 minutes [11].

Analyse de collections par couplage de la chromatographie en phase liquide en parallèle et de la spectrométrie de masse

Il est commercialisé depuis peu une interface LC/MS qui permet le couplage en parallèle de huit chromatographes en phase liquide à un seul spectromètre de masse équipé d'une source électrospray. Le principe de ce couplage est représenté *figure 2*. Un rotor sélectionne successivement par une fenêtre chacun des huit canaux et synchronise l'acquisition d'un spectre de masse et d'un signal UV dans chacun des huit fichiers d'acquisition. Le temps

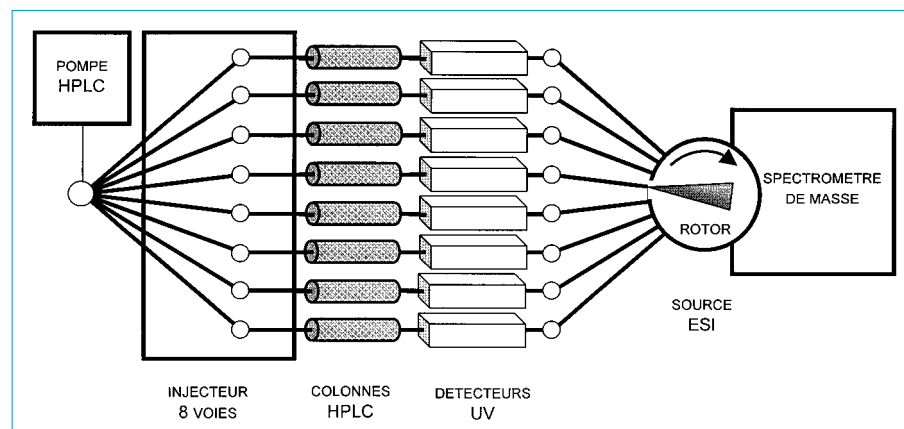


Figure 2 - Couplage LC/MS selon la technologie MUX™ développée par la société Micromass®.

de cycle de 1,6 seconde respecte l'intégrité des profils chromatographiques.

Analyse de collections par désorption laser assistée par matrice (MALDI)

La désorption laser assistée par matrice est susceptible d'être automatisée pour répondre aux besoins de l'analyse de collections à haut débit. P. Little [12] décrit un système capable de dispenser à l'aide d'un robot équipé de micropipettes piézo-électriques des volumes de quelques nanolitres de solutions de matrice et d'échantillon dans chacun des 100 puits d'une cible de silicium de 1 cm². L'ensemble est introduit dans le spectromètre de masse sur un support manœuvré par des moteurs pas à pas de telle sorte que chaque puits est placé successivement dans la zone de l'impact laser. L'acquisition des 100 spectres de masse est réalisée ainsi en moins de 6 minutes.

Exploitation des données

Devant les grandes quantités de données analytiques générées par des systèmes d'analyse à haut débit, plusieurs laboratoires ont été amenés à développer leurs logiciels d'exploitation de données afin de réduire au maximum certaines tâches répétitives. Ces logiciels d'interprétation sont capables d'identifier différents types d'ions (ions multichargés, ions adduits, etc.), de proposer des structures pour certaines impuretés, de définir des critères de pureté [13]. Des logiciels adaptés au contrôle de qualité de collections analysées par plaques de 96 puits ont été commercialisés. Les puits sont visualisés par différentes couleurs selon qu'une molécule possédant la masse moléculaire (ou la formule brute) attendue a été détectée dans le puits correspondant tout en respectant certains critères de pureté.

Autres développements

Le codage isotopique

Une molécule greffée sur une bille de résine ayant réagi positivement à un test pharmacologique peut être, soit identifiée directement, soit indirectement par la lecture d'un code constitué

généralement de molécules cosynthétisées sur le support solide et dont l'analyse présente l'avantage d'une plus grande simplicité. Un exemple intéressant est donné par Geysen qui met en œuvre la cosynthèse de dipeptides Gly-Gly dont chaque glycine comporte aucun, un ou deux atomes de carbone 13. Le massif isotopique de ces dipeptides protonés constitue un véritable « code-barre » qui peut être décodé par spectrométrie de masse [14].

La chromatographie préparative automatisée

La chromatographie liquide préparative assistée par spectrométrie de masse est aujourd'hui proposée commercialement [15-16]. Ces systèmes permettent de purifier automatiquement quelques milligrammes de grands nombres de produits, ce qui a pour effet d'accroître la fiabilité des tests pharmacologiques et de simplifier les mises au point de synthèses combinatoires.

Le « screening »

Les technologies utilisant la spectrométrie de masse en tant que détecteur lors d'expériences de « screening » se développent rapidement. Des inhibiteurs de réactions enzymatiques entre plusieurs cibles et des bibliothèques peuvent être mis en évidence à raison de 4 000 échantillons disposés sur le porte-échantillons de 20 cm² d'un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'une source MALDI [17]. Les ligands d'une bibliothèque les plus fortement liés à un récepteur peuvent être identifiés par spectrométrie de masse couplée à des techniques de sélection par affinité. Par exemple, les complexes récepteur-ligand, obtenus par incubation d'une bibliothèque avec un récepteur, après avoir été séparés des composés non liés par chromatographie d'exclusion, sont dissociés et les ligands résultants identifiés par spectrométrie de masse [18-19].

Conclusion

La spectrométrie de masse intervient à toutes les étapes de la découverte d'une molécule active et prend toute sa part dans le développement de la chimie combinatoire. L'apparition de nouveaux

spectromètres de masse à temps de vol résolutifs équipés de source électrospray ou à désorption laser rend routinières les mesures précises de masse et la détermination des compositions élémentaires. De même, l'information structurale est aisément obtenue à partir d'expérience MSⁿ à l'aide de trappes ioniques. Des systèmes à détecteurs multiples LC/UV/N/MS (N : détecteur d'azote à chimioluminescence) installés en ligne répondent aux questions de pureté, de quantification et d'identification des molécules constituant les bibliothèques ou les collections [20]. Des progrès en terme de miniaturisation, d'automatisation et de vitesse d'analyse sont encore imaginables en spectrométrie de masse et conditionneront le développement de la chimie combinatoire.

Références

- [1] Süßmuth R.D., Jung G., *Journal of Chromatography B*, **1999**, 725, p. 49-65.
- [2] Loo J.A., *Eur. Mass Spectrom.*, **1997**, 3, p. 93-104.
- [3] Loo J.A., DeJohn D.E., Ogorzalek R.R., Andrews P.C., *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **1996**, p. 319-325.
- [4] Blom K.F., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 4354-4362.
- [5] Hughes I., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, p. 3804-3811.
- [6] Metzger J.W., Kempter C., Wiesmüller K.H., Jung G., *Anal. Biochem.*, **1994**, 219, p. 261-277.
- [7] Boutin J.A., Hennig P., Lambert P.-H., Bertin S., Petit L., Mahieu J.-P., Serkiz B., Volland J.-P., Fauchère J.-L., *Anal. Biochem.*, **1996**, 234, p. 126-141.
- [8] Lambert P.-H., Boutin J.A., Bertin S., Fauchère J.-L., Volland J.-P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, p. 1971-1976.
- [9] Wang T., Zeng L., Strader T., Burtonet L., Kassel D.B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, p. 1123-1129.
- [10] Marshall P.S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, p. 778-781.
- [11] Ventura M.C., Farrell W.P., Aurigemma C.M., Greig M.J., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, p. 4223-4231.
- [12] Little D.P., Cornish T.J., O'Donnell M.J., Braun A., Cotter R.J., Köster H., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 4540-4546.
- [13] Tong H., Bell D., Tabei K., Siegel M.S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, p. 1174-1187.
- [14] Geysen H.M., Wagner C.D., Bodnar W.M., Markworth C.J., Parke G.J., Schoenen F.J., Wagner D.S., Kinder D.S., *Chem. Biol.*, **1996**, 3, p. 679-688.
- [15] Zeng L., Burton L., Yung K., Shushan B., Kassel D.B., *Journal of Chromatography A*, **1998**, 794, p. 3-13.
- [16] Kiplinger J.P., Cole R.O., Robinson S., Roskamp E.J., Ware R.S., O'Connell H.J., Brailsford A., Batt J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, p. 658-664.
- [17] Hsieh F., Keshishian H., Muir C., *J. Biomol. Screening*, **1998**, 3, p. 189-198.
- [18] Kaur S., McGuire L., Tang D., Dollinger G., Huebner V., *J. Protein Chem.*, **1997**, 16, p. 505-511.
- [19] Hsieh F., Gordon N., Regnier F., Afeyan N., Martin S.A., Vella G.J., *Mol. Diversity*, **1996**, 2, p. 189-196.
- [20] Taylor E.W., Qian M.G., Dollinger G.D., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 3339-3347.