La pénicilline II - Détermination de la structure et synthèse d'un antibiotique

Publié le 15.10.06 | Par Hagop Demirdjian

Au regard des techniques actuelles de caractérisation, la détermination de la structure d'une molécule telle que la pénicilline peut sembler simple aux chimistes d'aujourd'hui. Pourtant, au début des années 1940, la caractérisation d'un composé organique est une opération longue et délicate. Pour le comprendre nous allons rappeler de quels outils d'analyse disposaient les chimistes avant 1945.

Cet article fait suite à « la pénicilline I - Découverte d'un antibiotique » qui retrace l'histoire de la découverte des propriétés bactéricides de la pénicilline et la mise au point des procédés de production industrielle. Cette molécule est devenue le premier antibiotique à connaître une très large diffusion alors même que sa structure n'était pas établie de façon certaine. Le présent article s'intéresse à la détermination de sa structure ainsi qu'à sa synthèse.

1. Techniques d'analyse de la structure chimique

1.1. L'analyse structurale dans les années 1940

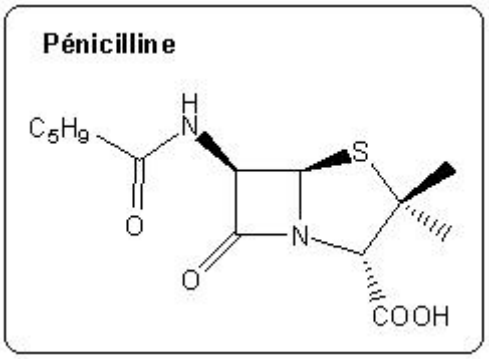


Figure 1. Structure de la pénicilline.

Il faut d'abord garder à l'esprit que les méthodes de purification sont peu nombreuses et d'une efficacité limitée. Elles se résument essentiellement à deux techniques : la recristallisation et la distillation [1a]. La chromatographie en phase gazeuse ne se développe qu'au milieu des années 1950 et lorsque Abraham utilise la chromatographie d'adsorption pour purifier la pénicilline en 1940, il fait figure de pionnier : c'est une technique qui vient d'apparaître [2].

Les chimistes d'alors ne disposent de presque aucune des techniques spectroscopiques d'analyse structurale utilisées en routine aujourd'hui. La diffraction des rayons X commence à peine à être utilisée avec succès sur des cristaux moléculaires de molécules aromatiques simples [3]. Ce sont les premiers balbutiements de l'analyse par spectroscopie UV-visible et infrarouge : la spectroscopie UV-visible commencera à être appliquée sur des grosses molécules organiques à partir de 1945. C'est également à cette période que la spectroscopie infrarouge devient un outil d'analyse [4]. La spectrométrie de masse est utilisée pour analyser les molécules organiques à partir du milieu des années 1950 et il faut attendre les années 1960 pour que la RMN soit utilisée en chimie.

En 1940, l'analyse structurale est encore un processus très long qui peut prendre plusieurs années, voire plusieurs décennies comme dans le cas des stérols [1b]. Ernst Chain[1] dira plus tard que « la pénicilline est probablement la dernière molécule organique d'origine biologique à avoir été analysée en faisant appel aux méthodes classiques de la chimie organique » [5].

Ces méthodes sont les suivantes [1c] :

- L'analyse élémentaire : la dégradation d'une quantité de l'ordre de la centaine de milligramme de substance permet de déterminer ses proportions en carbone, hydrogène, azote et oxygène[2]. Elle permet également d'estimer la quantité d'halogènes, de phosphore, de soufre et des autres éléments. La micro-analyse permet de travailler sur des masses de produits inférieures à 5 mg.
- La cryométrie et l'ébulliométrie permettent de déterminer la masse molaire.
- Les tests chimiques permettent de connaître les fonctions présentes.
- La dégradation de la molécule, en général par oxydation : les différents produits de dégradation sont à leur tour soumis à l'analyse structurale pour essayer de reconstruire la molécule de départ.
- La dérivation de la molécule ou de ses résidus de dégradation par des voies de transformation connues.

  Dans les deux derniers cas, on compare les fragments issus de la dérivation et de la dégradation à des produits dont la structure est connue.

L'exemple suivant montre comment établir, à l'aide de ces méthodes, la structure de deux molécules de même formule brute $C_2H_4O_2$.

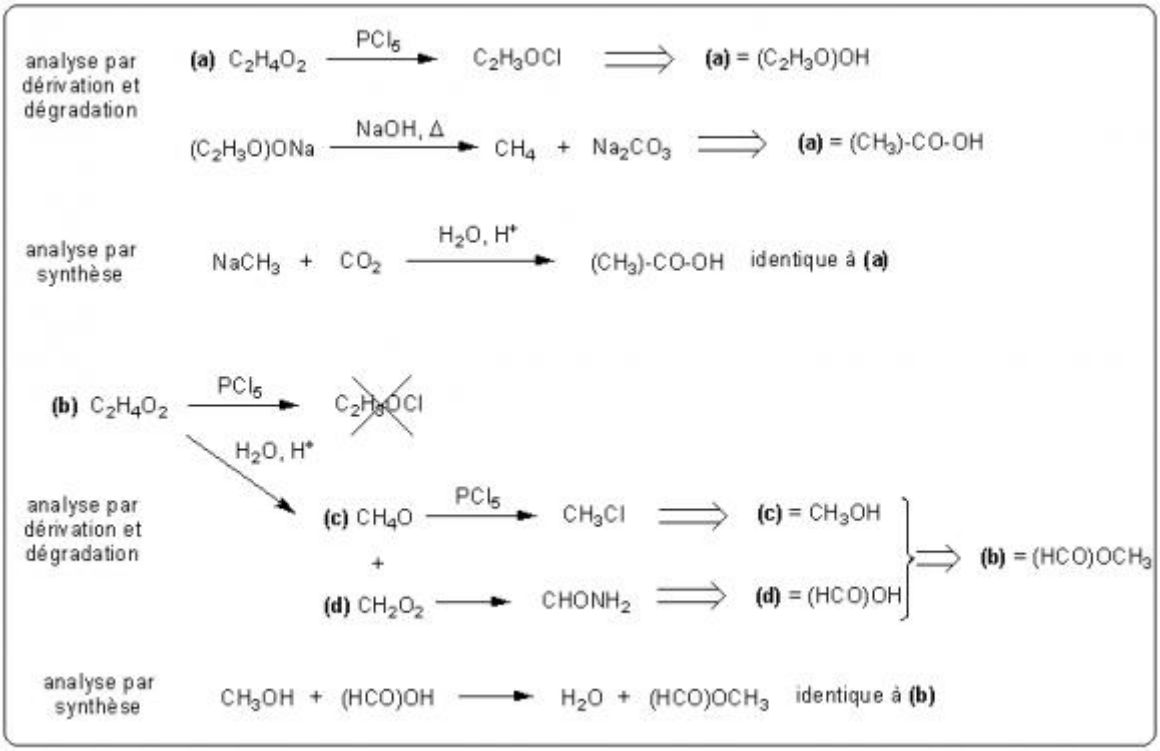


Figure 2. Exemple d'analyse structurale de deux molécules de même formule brute $C_2H_4O_2$.

La molécule (a) soumise à l'action du pentachlorure de phosphore donne un composé chloré. Cela prouve la présence d'un groupe hydroxyle au sein de (a) qui peut donc être ré-écrit $(C_2H_3O)OH$. Son sel de sodium $(C_2H_3O)ONa$ soumis à l'action de la soude NaOH à haute température produit un gaz identifié comme étant le méthane CH_4 et le sel Na_2CO_3. Un des atomes d'hydrogène du méthane provient de la soude, (a) contient donc un radical méthyl $-CH_3$. Cela permet de conclure que la structure de la molécule (a) est (CH_3)-CO-OH avec une double liaison C=O pour respecter la valence du carbone. C'est l'acide éthanoïque.

Cette structure peut être confirmée par synthèse. Il est connu que l'action de $NaCH_3$ sur CO_2 mène à l'acide éthanoïque. On peut vérifier que le composé synthétique est identique en tout point à (a).

La molécule (b) ne réagit pas avec le pentachlorure de phosphore, ce qui permet d'exclure la présence d'un groupe hydroxyle. En revanche, son hydrolyse permet d'obtenir (c) de formule CH_4O et (d) de formule CH_2O_2. L'obtention de CH_3Cl par action du

pentachlorure de phosphore permet d'identifier (c) au méthanol CH_3OH, et la substitution par NH_2 dans (d) prouve l'existence d'un groupe hydroxyle, ce qui permet d'aboutir à la structure (HCO)OH. (b) doit être le produit de condensation de (c) et (d), soit $CH_3O(OCH)$, le méthanoate de méthyle.

Vérification par synthèse : le chauffage en milieu acide d'un mélange de méthanol et d'acide méthanoïque produit de l'eau et le méthanoate de méthyle en tout point identique à (b).

Cet exemple montre que, même pour une molécule simple (moins de dix atomes, une seule fonction chimique, aucun stéréocentre), l'analyse requiert la mise en oeuvre de plusieurs cycles de réaction / purification / caractérisation. On mesure dès lors les difficultés rencontrées pour des molécules de plusieurs dizaines d'atomes, polyfonctionnelles et à plusieurs stéréocentres comme la pénicilline.

1.2. Pourquoi essayer de déterminer la structure ? Une stratégie de production

Avant d'examiner plus précisément l'établissement de la structure de la pénicilline, il est utile de s'interroger sur le but poursuivi par les chercheurs. Il faut garder à l'esprit que la production de pénicilline entre 1940 et 1942 est très faible. Les doses obtenues par fermentation à partir du champignon Penicillium notatum permettent à peine de réaliser les essais cliniques. La possibilité de produire une substance permettant d'éviter l'infection des blessures est, en ces temps de guerre, une source de motivation très forte pour mettre au point une voie de synthèse totale de la molécule afin de la mettre en production industrielle. C'est dans l'espoir de mettre au point cette synthèse que Ernst Chain et Edward Abraham entament à Oxford, vers la fin de 1942, une collaboration avec Wilson Baker et Sir Robert Robinson[3] . Cette petite équipe collabore également avec Dorothy Hodgkin[4], pionnière des caractérisations structurales par diffraction des rayons X. Elle s'enrichira d'une quinzaine de collaborateurs au cours des années. L'effort de guerre amènera jusqu'à un millier de chimistes anglais et américains à travailler à la synthèse de la pénicilline jusqu'en 1945 [6].

2. Élucidation de la structure de la pénicilline

2.1. Un composé soufré ?

À la fin de 1941, très peu de caractéristiques structurales de la pénicilline sont établies. Les chercheurs ont constaté, en essayant d'améliorer le processus d'extraction, que l'activité antibactérienne disparaît en milieu acide ou basique et l'analyse élémentaire montre que la molécule contient de l'azote mais pas de soufre. Cette dernière donnée est très importante puisqu'elle oriente toutes les analyses ultérieures. En 1942, les produits de dégradation par hydrolyse acide sont caractérisés : il s'agit de dioxyde de carbone, d'un aldéhyde et d'un acide aminé. Ce dernier sera isolé par Abraham qui le nomme « pénicillamine ». La pénicillamine est analysée en posant l'hypothèse d'une molécule non-soufrée mais de nombreux résultats sont incohérents. La substance cristallisée est confiée pour analyse à Hodgkin et Baker. Ils remarquent que les quantités des éléments C, H, N déterminées par l'analyse élémentaire conduisent à déduire une proportion aberrante d'oxygène. Ils suggèrent de reconsidérer la présence du soufre et Baker prouvera cette présence par un test chimique : l'analyse élémentaire de départ était erronée. Cette correction permet d'interpréter plusieurs observations restées sans explications jusque là et relance l'activité des chercheurs.

2.2. Les différentes hypothèses

De nombreux progrès sont faits en 1943 : la structure de plusieurs produits de dégradation de la pénicilline est élucidée à l'aide de caractérisations chimiques et des hypothèses concernant la structure de la pénicilline sont émises. La première émane de Robinson qui propose l'existence d'un noyau oxazolone (figure 3 **a**). Chain et Abraham en revanche soutiennent qu'un noyau β-lactame, c'est à dire un amide cyclique à 4 chaînons, est au coeur de la structure (figure 3 **b**).

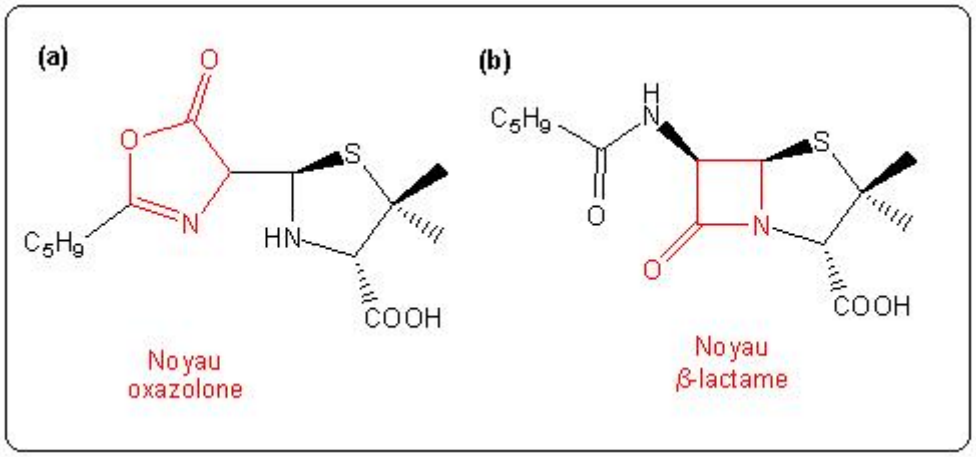


Figure 3. Structures proposées pour la pénicilline par Robinson (a) et Chain et Abraham (b).

D'autres structures seront proposées par des équipes américaines, mais jusqu'en 1945 c'est la structure oxazolone de Robinson qui est privilégiée par la majorité des chercheurs. Son grand mérite est de permettre d'interpréter la dégradation de la pénicilline à pH = 2 en une molécule qui présente deux groupes acides et un groupe basique et dont la structure avait été établie par Robinson également (figure 4) [6-7].

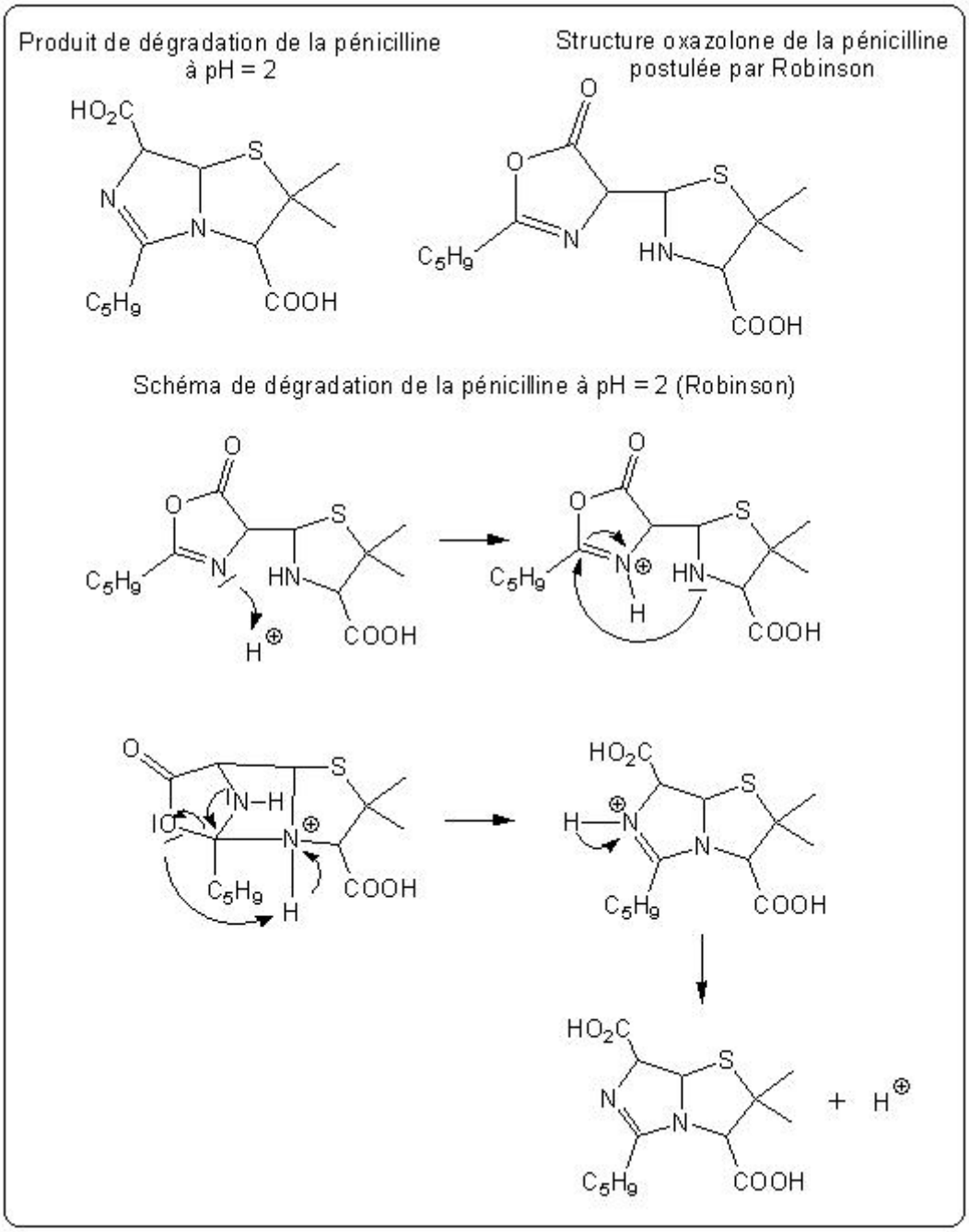


Figure 4. Raisonnement de Robinson pour justifier la structure oxazolone.

L'hypothèse β-lactame est écartée a priori car la réactivité de la pénicilline est très différente de celle des β-lactames isolées qui sont beaucoup moins sensibles à l'hydrolyse acide. Pourtant c'est bien cette structure β-lactame qui est mise en évidence par la cristallographie par diffraction des rayons X en 1945 par Hodgkin. Robert B. Woodward[5] proposera une interprétation à la différence de réactivité entre les β-lactames libres et la fonction présente dans la pénicilline. Au sein de cette dernière, la β-lactame fait partie d'un système bicyclique, et l'environnement de l'azote ne peut pas être plan car cela engendrerait une tension de cycle trop grande. Ceci empêche la délocalisation électronique sur la fonction amide telle qu'observée sur une β-lactame libre (figure 5).

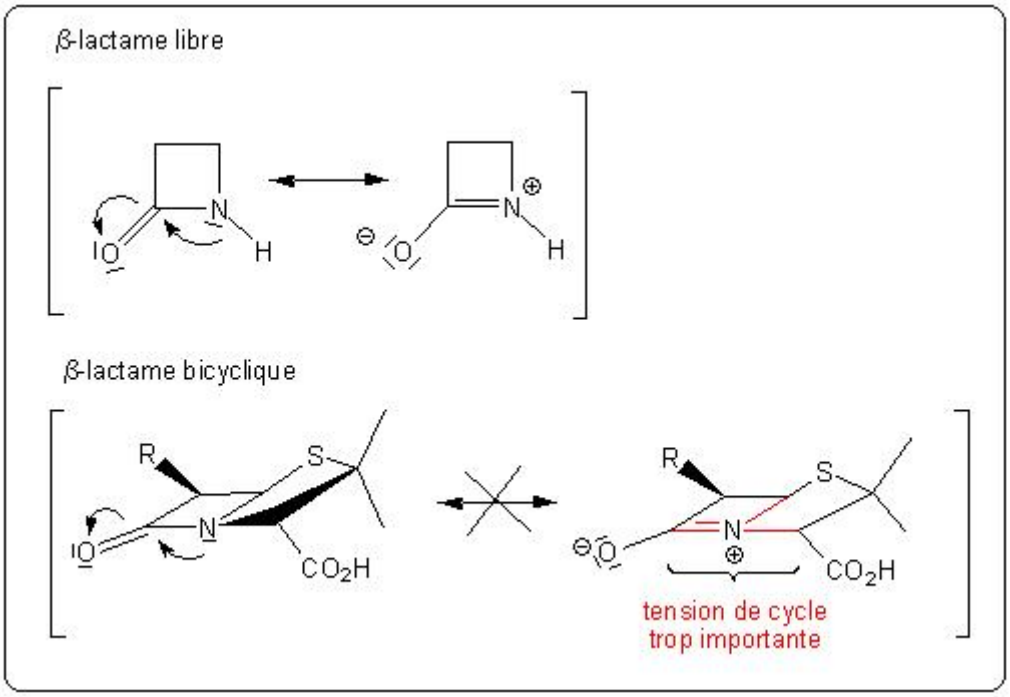


Figure 5. Différence de réactivité entre la β-lactame libre et la β-lactame bicyclique.

Or cette délocalisation a pour effet de diminuer l'électrophilie du carbonyle. La conclusion est que le carbonyle de la pénicilline est beaucoup plus électrophile que celui d'une β-lactame libre, il est donc beaucoup plus réactif par addition nucléophile et c'est pourquoi sa désactivation est si aisée en milieu acide (figure 6) [6-8]. On peut remarquer que la structure proposée par Robinson apparaît dans ce mécanisme comme un intermédiaire réactionnel.

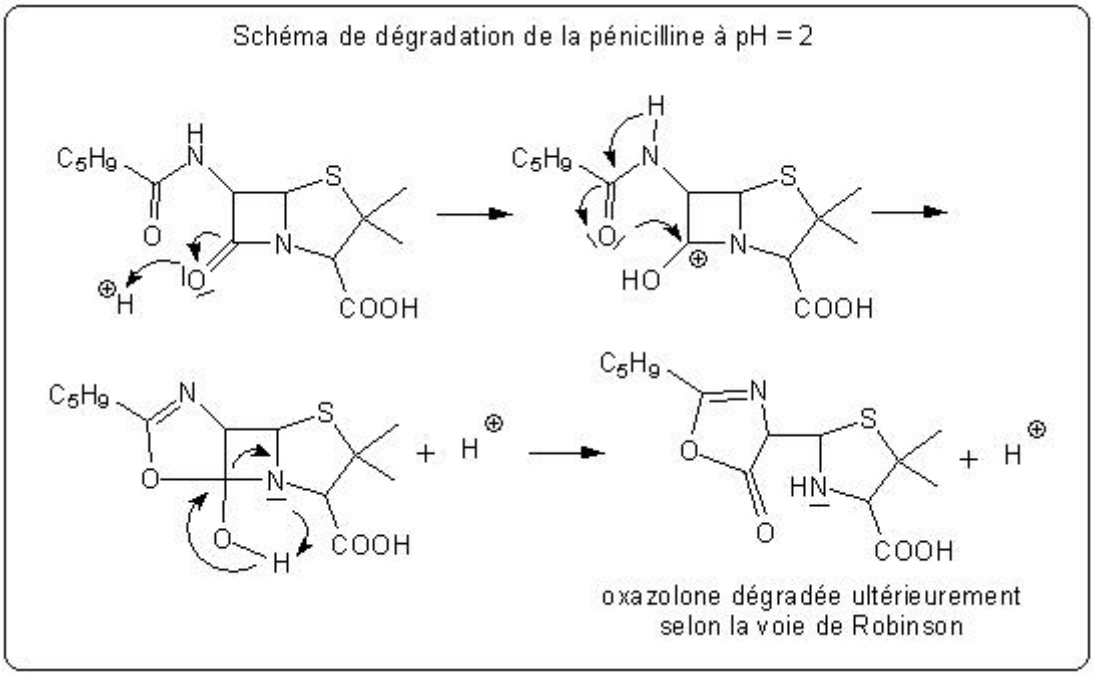


Figure 6. Schéma de dégradation de la pénicilline en milieu acide.

Il aura donc fallu près de trois ans de recherches pour établir la structure de la pénicilline. Il y a alors en Grande-Bretagne et aux États-Unis près d'un millier de chimistes qui tentent de mettre au point sa synthèse totale.

3. La synthèse totale

3.1. Des difficultés inattendues

La voie de synthèse la plus explorée alors repose sur des tentatives de condensation de dérivés d'oxazolones avec la pénicillamine (figure 7).

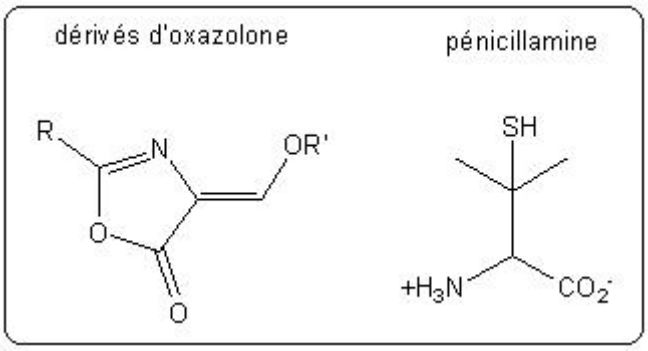


Figure 7. Tentative de synthèse de la pénicilline par condensation de deux molécules.

Plusieurs produits de condensation sont isolés et analysés, mais aucun ne présente d'activité antibiotique. La synthèse de la pénicilline se révèle plus difficile que ne l'avaient espéré les chercheurs [6].

3.2. Une synthèse inutile ?

Mais le principal frein à la mise au point de cette synthèse fut sans doute l'absence de motivation. En effet l'effort de guerre a permis de mettre au point un procédé par fermentation [2]. En 1945, la molécule est produite en quantités telles que les restrictions sur sa distribution sont levées, la mise au point d'une synthèse totale n'est plus une priorité. Vers la fin 1945 une molécule dont les caractéristiques sont en tout point semblables à celle de la benzylpénicilline est synthétisée avec un rendement de... 0,1 % ! Les espoirs d'amélioration de ce rendement sont faibles et la recherche dans ce domaine connaît une désaffection rapide. Elle est totalement abandonnée dès 1946.

3.3. Synthèse totale et pénicilline synthétiques

Il faut attendre 1957 pour que John Sheehan, chimiste américain au Massachusetts Institute of Technology, mette au point la synthèse totale de la phénoxyméthylpénicilline, ou « pénicilline V » (figure 8).

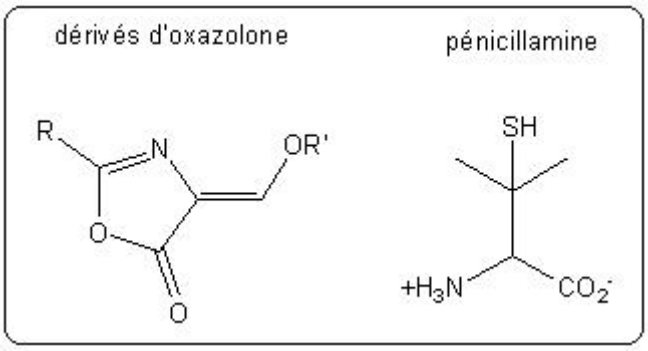


Figure 8. Structure de la pénicilline V.

Cette synthèse sera publiée en 1959 [9]. Il est clair à cette époque qu'aucun procédé de synthèse totale n'est compétitif par rapport aux méthodes industrielles de fermentation, mais son intérêt est ailleurs. En effet, la méthodologie de Sheehan lui permet d'obtenir des dérivés de la pénicilline qui en diffèrent par la chaîne latérale de la fonction amide. Il ouvre ainsi une voie de synthèse à de nouvelles substances qui ne sont pas disponibles dans la nature et qui peuvent présenter des propriétés antibiotiques : ce sont les pénicillines synthétiques.

4. Bibliographie et ressources en ligne

[1] a) L. Gattermann « Laboratory methods of organic chemistry » 24ème éd. 1937, MacMillan. **b)** L. F. Fieser, M. Fieser « Natural products related to phenantrene » 3ème éd. 1949, Reinhold. **c)** P. Karrer « Organic chemistry » 3ème éd. 1947, Elsevier.

[2] « la pénicilline I - Découverte d'un antibiotique », publié sur CultureSciences-Chimie.

[3] L'histoire de la diffraction des rayons X en ligne sur le site de l'Union Internationale de Cristallographie. P. P. Ewald Fifty Years of X-Ray Diffraction.

[4] B. Vidal, « Histoire de la chimie », Que sais-je ? Puf, 1998.

[5] B. Weintraub, « Ernst Boris Chain (1906-1979) and Penicillin », Bull. Israel Chem. Soc. 29, **13**, 2003.

[6] E. P. Abraham, « Sir Robert Robinson and the early story of penicillin », Nat. Prod. Rep. 41, **4**, 1987.

[7] E. B. Chain « The chemical structure of the penicillins » 1946, Nobel Lectures. En ligne sur le site de la fondation Nobel.

[8] G. L. Patrick « Chimie pharmaceutique » 2003, De Boeck.

[9] J. C. Sheehan, K. R. Henery-Logan « The total synthesis of penicillin V » JACS, 3089, **81**, 1959.

5. Notes

[1] Ernst Chain : prix Nobel de physiologie-médecine pour « la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses », partagé avec Florey et Flemming en 1945.

[2] La quantité d'oxygène est en général déterminée de manière indirecte, par différence entre la masse de carbone, d'hydrogène et d'azote et la masse molaire de la substance.

[3] Sir Robert Robinson : prix Nobel de chimie en 1947 pour « ses recherches d'importance biologique sur les substances extraites des plantes et spécialement sur les alcaloïdes ».

[4] Dorothy Hodgkin : prix Nobel de chimie 1964 pour la détermination de structures biochimiques importantes (pénicilline et vitamine B12) par diffraction des rayons X.

[5] Robert Burns Woodward : prix Nobel de chimie 1965 pour ses accomplissements exceptionnels en synthèse organique.

CRÉDITS

RELECTURE SCIENTIFIQUE

Jean-Bernard Baudin

Professeur à l'Ecole Normale Supérieure

AUTEUR(S)/AUTRICE(S) ET MISE EN LIGNE

Hagop Demirdjian

Docteur en chimie théorique, ancien élève de l'École Normale Supérieure Lyon, responsable éditorial du site CultureSciences-Chimie de 2004 à 2008.