

L'utilisation des micro-organismes en synthèse organique *

par Paul Bellet

(Société Roussel-Uclaf, 35, Bd des Invalides, 75007 Paris.)

I. Le microbe, hier, aujourd'hui, demain

En une génération, le concept de micro-organisme a radicalement changé d'aspect.

Pendant la dernière guerre l'enseignement de la microbiologie se limitait encore à l'énumération d'une cinquantaine de microbes, moisissures et autres champignons inférieurs, affreusement pathogènes pour la plupart. Outre leur méfaits, on ne connaissait guère que leur morphologie, c'est-à-dire leur aspect extérieur. Le spirochète était ce qui se faisait de plus petit dans le domaine de l'observable, et si l'on parlait des virus nul ne les avait vus, la microscopie électronique n'étant pas encore opérationnelle.

L'industrie utilisait empiriquement les bons offices de levures, lactobacilles, *Acetobacter*, *Penicillium* et *aspergillus*. La capture de l'azote atmosphérique par les bactéries nitrifiantes et les *Rhizobia* était observée d'un œil envieux par les chimistes qui avaient beaucoup de peine à tirer parti de ce gaz inerte. Dans les collections dormaient quelques *Pseudomonas*, bactéries rudimentaires aujourd'hui utilisées pour la biosynthèse de protéines du pétrole, mais alors considérées comme rigoureusement dépourvues d'intérêt. Enfin le mot *Streptomyces* n'était connu que de rares initiés car la streptomycine restait à découvrir.

Silencieux dans leurs laboratoires, les microbiologistes, hommes du microscope, des pH 5 à 8, des étuves à 37 °C, ignoraient les chimistes, ces gens pressés, avides de quantitatif, de vapeurs rutilantes et de réactifs traumatisants. L'image traditionnelle des hommes a bien changé, celle du micro-organisme encore plus.

L'isolement et l'étude des produits de la biosynthèse microbiologique ont mis à notre disposition des substances précieuses, surtout depuis la guerre, avec les antibiotiques et les cobalamines. Il en est résulté des conséquences d'importance capitale :

- révolution technologique permettant de conduire, dans des conditions précises et sous contrôle automatique, des fermentations sélectives, sur des unités de 100 à 200 m³, en l'absence de contaminations. C'est la naissance de la bio-industrie,
- révolution microbiologique, à la base des progrès de la biologie contemporaine,
- enfin, la connaissance de la biochimie des micro-organismes a conduit à leur utilisation comme réactifs stéréospécifiques et économiques, au cours des synthèses chimiques multistades, réalisant ainsi l'union de deux disciplines que les considérations philosophiques et didactiques du 19^e siècle avaient injustement isolées.

Le micro-organisme apparaît aujourd'hui comme une micro-usine, polyvalente, indéfiniment et rapidement multipliable, sobre dans ses besoins, étonnamment transformable par sélection, adaptation et

* Conférence présentée à l'École Supérieure de Chimie Industrielle de Lyon, le 28 novembre 1979, et organisée par l'Association Française des Techniciens du Pétrole, en association avec la Section sud-est de la Société de Chimie Industrielle et l'Association pour le Développement de l'Industrie Chimique dans la Région Rhône-Alpes.

mutation. Mieux encore, les recombinaisons génétiques (dites manipulations), réalisées depuis 1971-1972, ont montré la possibilité de prélever une partie de l'équipement nucléaire d'une espèce donneuse et de l'insérer dans celui d'une espèce réceptrice. Ce transfert d'ADN, donc des propriétés qu'il supporte, est d'emblée héréditaire.

Le croisement interspécifique, cette création d'espèces nouvelles que 3 milliards d'années d'évolution bactérienne n'avaient pu réaliser, vient d'être accompli sous nos yeux. Ses conséquences ne peuvent encore être appréciées dans toute leur ampleur.

II. La réaction microbiologique

Lorsqu'une substance (ou substrat) est mise en présence d'un système enzymatique, trois éventualités peuvent se produire :

- aucune réaction n'a lieu et la substance demeure inaltérée,
- inversement, plusieurs réactions se succèdent et la substance est profondément, sinon totalement dégradée ; c'est le cas du glucose métabolisé dans l'organisme animal ou dans un milieu de culture microbienne,
- dans les cas intermédiaires, on assiste à des modifications discrètes, intéressant un ou plusieurs motifs structuraux de la molécule, mais qui en respectent l'agencement général et la conformation. On parle alors de bioconversion ou biotransformation. La structure n'étant pas essentiellement modifiée, on peut espérer que le produit de la réaction conservera quelques unes sinon toutes les propriétés biologiques de la molécule de départ.

Une bioconversion peut être effectuée *in vitro*, à l'aide de préparations enzymatiques ou d'homogénats de tissus (foie, rein), mais l'utilisation de telles préparations présente plusieurs inconvénients :

- difficulté d'obtenir une constance d'activité d'une préparation à l'autre,
- faibles quantités accessibles,
- prix souvent très élevé de ces sources d'enzymes.

Aussi l'emploi des enzymes purifiées et des homogénats de tissus est-il réservé à des études particulières, au laboratoire de recherches, ou d'analyses biochimiques, mais exceptionnellement à des fins industrielles.

La grande diversité des micro-organismes, la richesse de leur équipement enzymatique, la facilité avec laquelle on peut les cultiver de façon très reproductible, aussi bien au laboratoire qu'en atelier, en font des outils particulièrement intéressants et très maniables pour l'étude expérimentale de réactions stéréosélectives, puis leur application à l'échelle industrielle, d'autant plus que ces réactions microbiologiques s'effectuent avec un rendement souvent élevé.

Quelques caractéristiques de la réaction enzymatique

Étant des réactions enzymatiques, les bioconversions microbiologiques obéissent aux lois de la biocatalyse. En particulier, leur spécificité est souvent très étroite. Des nombreuses enzymes que renferme un microbe, en général une seule agit sur un substrat déterminé et dans un contexte paramétrique donné.

Un exemple de biotransformations, particulièrement démonstratives quant à la spécificité enzymatique, est celui de l'hydrolyse de chacun des trois groupes méthoxyles de la griséofulvine, par des micro-organismes différents.

La sélectivité de ces déméthylations prouve en outre la diversité des hydrolases fongiques.

La spécificité de la réaction enzymatique s'explique lorsqu'on admet la nécessité d'une complémentarité de conformation entre l'enzyme et la molécule soumise à son action.

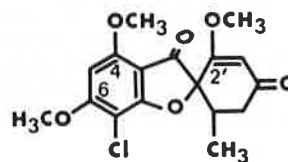
III. Exemples de réactions microbiologiques

Dans le domaine de la chimie thérapeutique, en particulier, la pratique industrielle offre plusieurs exemples d'intervention de micro-organismes en tant que réactifs stéréospécifiques au cours de synthèses multistades.

Actuellement, les applications industrielles des micro-organismes sont de trois sortes :

- multiplication d'éléments mycéliens ou cellulaires en vue d'une utilisation directe : lactobacilles, levures, *Penicillium*...
- extraction de produits de biosynthèse : acides aminés, vitamines, antibiotiques...
- utilisation des micro-organismes en lieu et place d'une réaction chimique :

C'est ce dernier aspect qui va être maintenant examiné.



Griséofulvine

Déméthylation sélective

<i>Bothrytis allii</i>	2'
<i>Microsporium canis</i>	4
<i>Cercospora melonis</i>	6

L'hypothèse d'une relation entre la structure et l'activité a été conçue il y a plus de 80 ans par Ehrlich, qui a proposé l'image clé-serrure.

C'est un lieu commun de rappeler qu'une réaction n'est utilisable à des fins industrielles qu'à la condition d'être reproductible dans ses aspects qualitatifs et quantitatifs. Mais la reproductibilité satisfaisante suppose une connaissance et une maîtrise de tous les paramètres de la réaction.

Or les paramètres de la réaction enzymatique par voie microbiologique sont nombreux : souche de micro-organisme, composition du milieu de culture, concentration en micro-organisme et en substrat, pH, température, aération, agitation, durée... Ces paramètres ne sont pas des facteurs indépendants les uns des autres ; ils forment un ensemble cohérent dont chaque terme ne peut varier que dans des limites très étroites si l'on veut obtenir, dans des conditions reproductibles, un rendement élevé. Ainsi une simple variation de 3 degrés centigrades ou de 0,5 unité pH peut faire passer le rendement d'une réaction enzymatique de 80 à 20 %.

Les types de réactions effectuées permettent de définir six classes d'enzymes (1) :

- oxydoréductases → transfert d'électrons d'un substrat à un autre,
- transférases → transfert d'un groupe d'atomes d'un substrat à un autre,
- hydrolases → rupture d'un enchaînement covalent entre 2 atomes avec fixation des ions d'une molécule d'eau sur les valences libérées,
- lyases → rupture d'un enchaînement mais sans intervention d'eau (il y a réarrangement),
- isomérases → remaniement interne d'une molécule,
- ligases ou synthétases → liaison entre deux atomes (C - C ou C-hétéroatome) ; l'énergie est fournie par couplage avec une réaction d'hydrolyse.

Étant de très grosses molécules, les enzymes des micro-organismes sont endocellulaires ; elles ne diffusent pas dans le milieu de culture. Les réactions qu'elles effectuent avec les substances (substrats) contenues dans ce milieu ont lieu au niveau de la paroi cellulaire qui, approximativement, peut être comparée à une membrane hémiperméable.

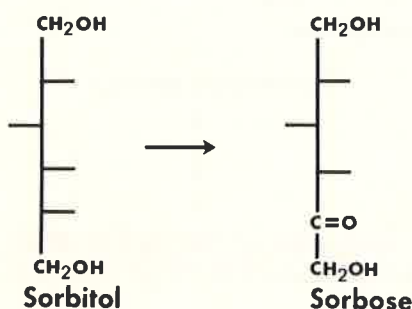
Selon les cas, il s'agit d'hémisynthèse (synthèse dite partielle) ou de synthèse totale.

La première consiste en la transformation progressive d'une molé-

cule initiale présentant déjà l'essentiel de la complexité et de la conformation générale du produit final; l'hémisynthèse s'accomplit suivant un type linéaire. Au contraire, la synthèse totale édifie la molécule désirée à partir de substances très simples voire, comme son nom l'indique, à partir des éléments eux-mêmes. Une telle synthèse se conçoit selon un type convergent. L'assemblage des éléments moléculaires peut ainsi être simultanément réalisé par plusieurs équipes, d'où un gain de temps.

III.1. Hémisynthèse de l'acide ascorbique

En 1896, Gabriel Bertrand a découvert qu'*Acetobacter xylinum* oxydait le sorbitol en sorbose. Beaucoup plus tard on a démontré le caractère hautement sélectif de cette réaction. L'oxydation en carbonyle de l'hydroxyle secondaire concerné n'est en effet possible que si cette fonction est localisée entre un hydroxyle primaire et un autre hydroxyle secondaire; en outre, les deux hydroxyles secondaires doivent obligatoirement être en position *cis*.

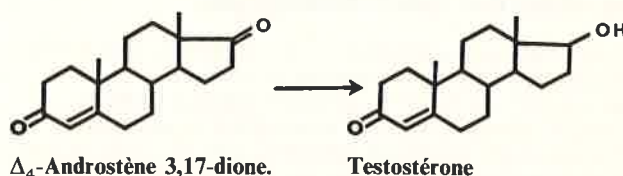


Cette biconversion connaît depuis une quarantaine d'années une application industrielle puisqu'elle constitue une étape importante de la synthèse de l'acide ascorbique. Le procédé initial de Reichstein

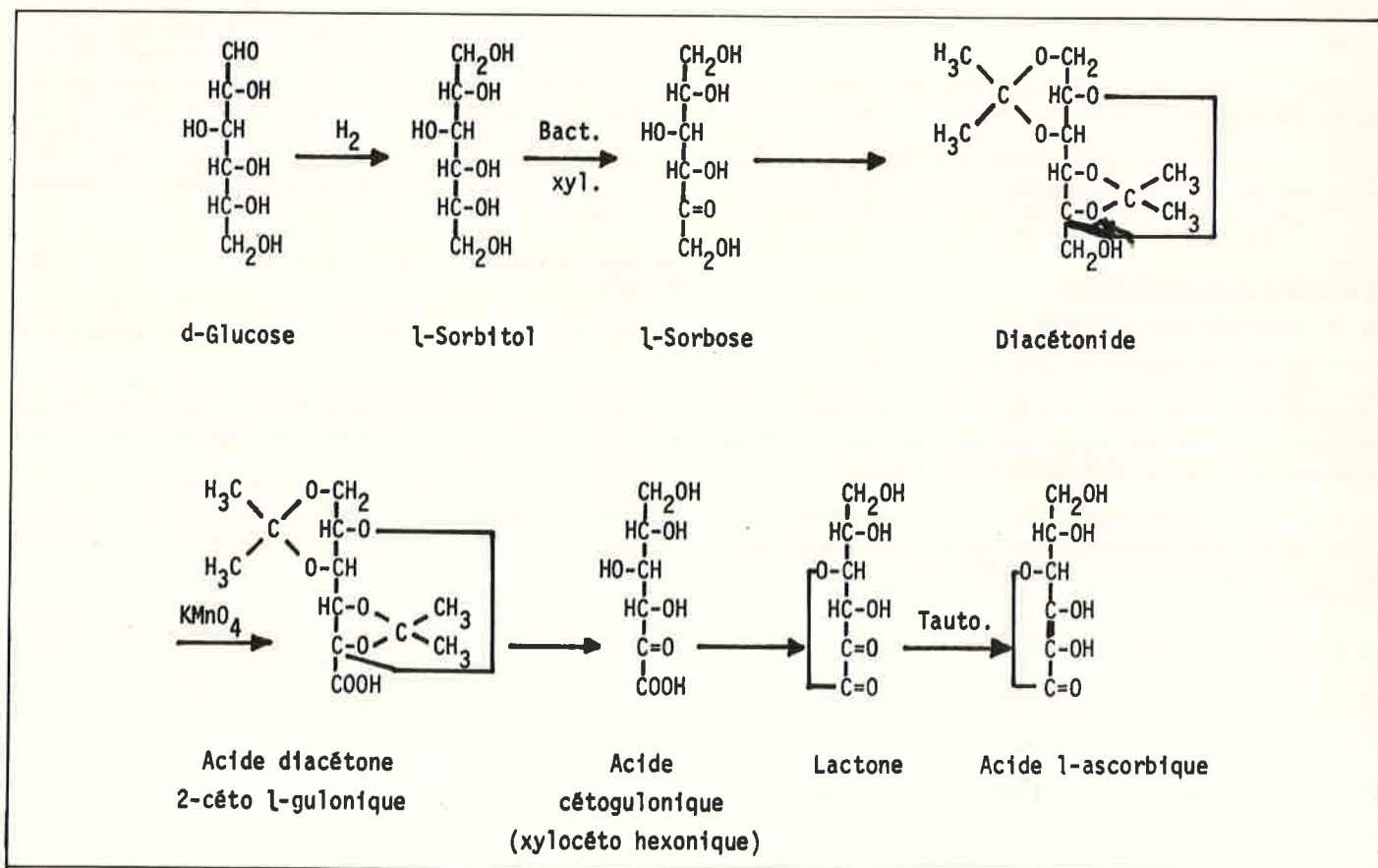
(2) a été progressivement amélioré. De 50% après 5 semaines de fermentation, le rendement est passé à 98% après 40 h, en opérant sous pression avec une levure ou *Acetobacter suboxydans* (6).

III.2. Hémisynthèse en série stéroïde

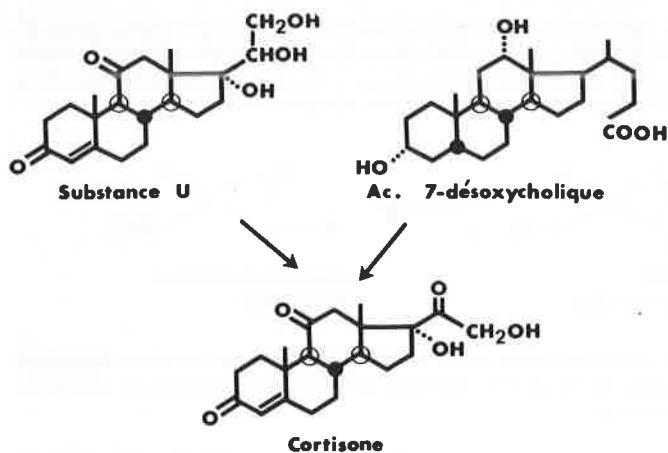
L'histoire des transformations microbiologiques est étroitement associée à celle de la chimie des hormones stéroïdes. Dès 1937, Mamoli et Vercellone décrivaient la réduction microbiologique du carbonyle en 17 de la Δ_4 -androstène-3,17-dione par une levure de bière contaminée.



Les auteurs ont constaté que, des deux isomères possibles, le micro-organisme fournit celui dont l'hydroxyle présente la même orientation que dans la testostérone naturelle. En dépit de son intérêt capital cette réaction n'a pu être utilisée, puisqu'à l'époque la technologie rudimentaire des fermentations ne permettait pas de la reproduire. En 1949, la découverte des effets anti-inflammatoires de la cortisone sur la polyarthrite chronique pose le problème de la production suffisante du nouvel agent thérapeutique. Il était évident que l'extraction des capsules surrénales ne pouvait assurer que des quantités minimales, et si, dès 1946, l'hémisynthèse de Sarett (4), à partir d'acides biliaires (oxygénés en 12), avait ouvert la voie chimique, le résultat s'en traduisait par un rendement inférieur à 1 pour 1 000 au bout de trente stades, dont six nécessaires pour déplacer l'atome d'oxygène de sa position 12 sur le carbone voisin. L'identité du produit final avait pu être établie par l'oxydation de l'hydroxyle en 20 de la substance U, autre hormone stéroïde de la cortico-surrénale.

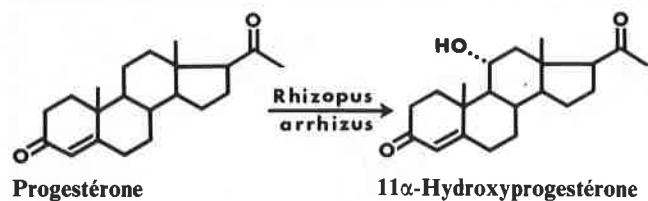


Synthèse de l'acide ascorbique



III.2.a. Hydroxylation

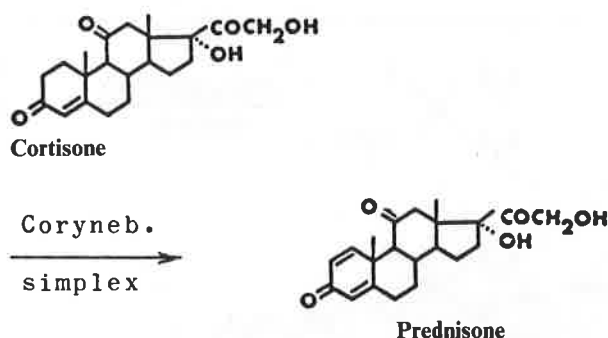
La présence d'un atome d'oxygène sur le cycle C des cortisoniques constituait donc une difficulté considérable pour le chimiste. La synthèse totale étant impensable sous une forme pratique en 1950, il restait à choisir un stéroïde naturel accessible et à tenter son oxygénation directe en position 11, ce qui fut réalisé par Peterson et Murray (5) sur la progestérone qui est aisément préparée à partir du cholestérol, des sapogénines ou des acides biliaires.



La moisissure qu'ils ont utilisée, *Rhizopus arrhizus*, fixe l'hydroxyle en position 11 α mais l'inversion ne constitue pas un problème majeur. On connaît maintenant d'autres champignons inférieurs appartenant aux genres *Curvularia* et *Cunninghamella* qui insèrent directement l'oxygène dans l'orientation 11 β convenable. Améliorée dans son rendement, cette réaction fondamentale est toujours pratiquée industriellement lorsque la matière première de l'hémisynthèse est dépourvue d'atome d'oxygène sur le cycle C. Tel est le cas des sapogénines des Dioscorées et Agaves (diosgénine, tigogénine, par exemple) qui sont à la base de l'industrie américaine des stéroïdes cortisoniques.

III.2.b. Formation de la double liaison en 1,2

La cortisone exerçant aux doses thérapeutiques des effets secondaires gênants sur divers métabolismes (équilibre Na/K, bilan azoté, rétention d'eau), il apparut bientôt nécessaire d'en retoucher la molécule pour tenter d'atténuer ces inconvénients. Les premières tentatives furent désastreuses; elles aboutissaient à l'inactivation de la substance, révélant ainsi une étroite relation entre la structure et l'activité physiologique. Mais on observa fortuitement que la création d'une insaturation en 1,2 était doublement favorable en accroissant l'action anti-inflammatoire et en diminuant les effets indésirables. Cette déshydrogénation d'abord obtenue par voie chimique est également effectuée par de nombreux micro-organismes, en particulier par *Corynebacterium simplex* (6).



En raison de son rendement excellent, elle concurrence facilement les procédés de synthèse et est largement appliquée dans l'industrie des dérivés cortisoniques.

III.3. Intervention des micro-organismes en synthèse totale

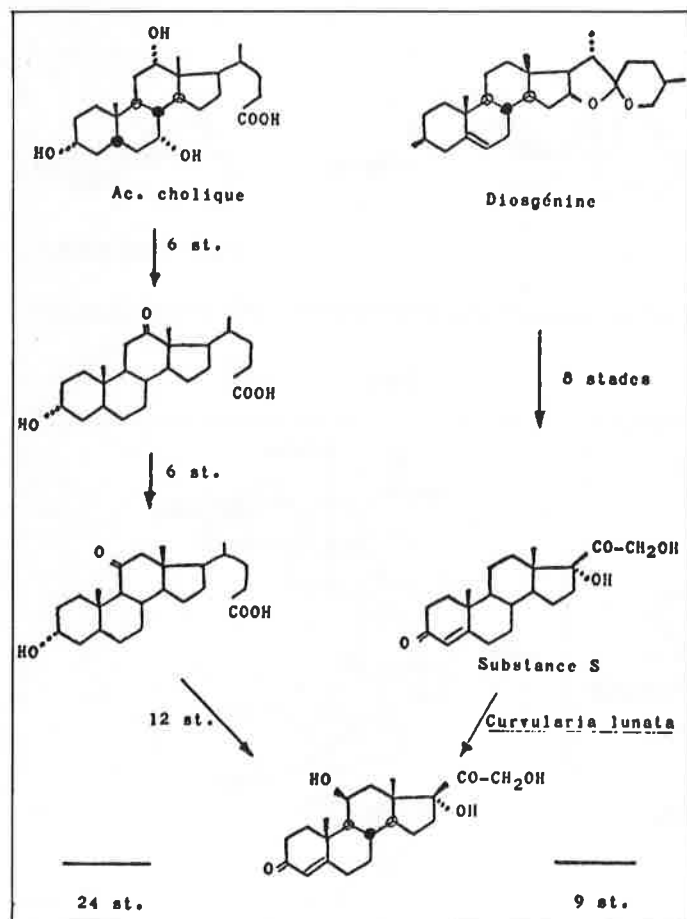
Une autre application intéressante des réactions microbiologiques consiste à les effectuer non plus sur un précurseur immédiat de la substance à produire, mais au début d'une synthèse complexe.

III.3.a. Série stéroïde

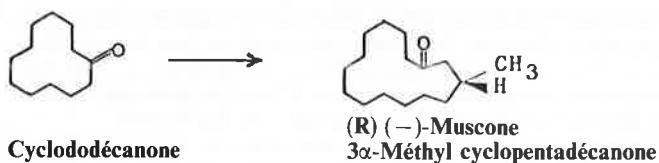
Une fois encore, l'exemple est emprunté au domaine des stéroïdes; domaine important puisque ces substances aux effets hormonaux, donc actives à l'échelle du milligramme ou de quelques microgrammes, sont produites annuellement dans le monde à raison de 120 à 150 tonnes par an.

Au niveau du laboratoire de recherche, la synthèse totale des stéroïdes est connue depuis une trentaine d'années (7), mais le premier procédé industriel économiquement compétitif avec les hémisynthèses à partir des sapogénines, du cholestérol ou des acides biliaires a été décrit par Velluz et ses collaborateurs en 1960 (8, 9).

La synthèse totale des hormones stéroïdes est particulièrement difficile puisque la plupart des molécules de cette classe comportent 4 à 6 centres d'asymétrie. Il est indispensable de recourir à des réactions stéréospécifiques lorsque cela est possible, sinon de procéder à des dédoublements de racémates, opérations particulièrement coûteuses.



Hémisynthèses de l'hydrocortisone

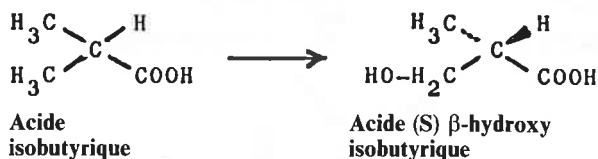


La muscone a été découverte, en 1926, par Ruzicka dans la glande à musc d'un chevrotaïn (*Moschus moschiferus* L., Cervidés). En raison de son intérêt en parfumerie, ce principe odorant a suscité un effort de recherche chimique considérable puisqu'une trentaine de schémas de synthèse ont été publiés à ce jour. A l'exception de la dernière en date, toutes ces synthèses conduisent à la muscone racémique et le produit lévogyre naturel ne peut être obtenu qu'au prix du dédoublement ultime.

En 1977 (12), les chimistes de Hoffmann-Laroche ont décrit une synthèse totale stéréospécifique en 15 stades dont le principe est l'élargissement à 15 atomes de carbone du cycle en C₁₂ de la cyclododécanone. Les atomes de carbone nécessaires sont fournis par un acide en C₄ qui, en outre, apporte le seul centre d'asymétrie de la (-)-muscone, présentant le groupe méthyle extracyclique convenablement orienté.

Le premier stade de la synthèse consiste à créer le centre d'asymétrie

par intervention d'un micro-organisme. La matière première est un réactif banal, l'acide isobutyrique. L'un des groupes méthyles de cette molécule prochirale est oxydé par la bactérie *Pseudomonas putida* en acide (S)- β -hydroxyisobutyrique optiquement actif.

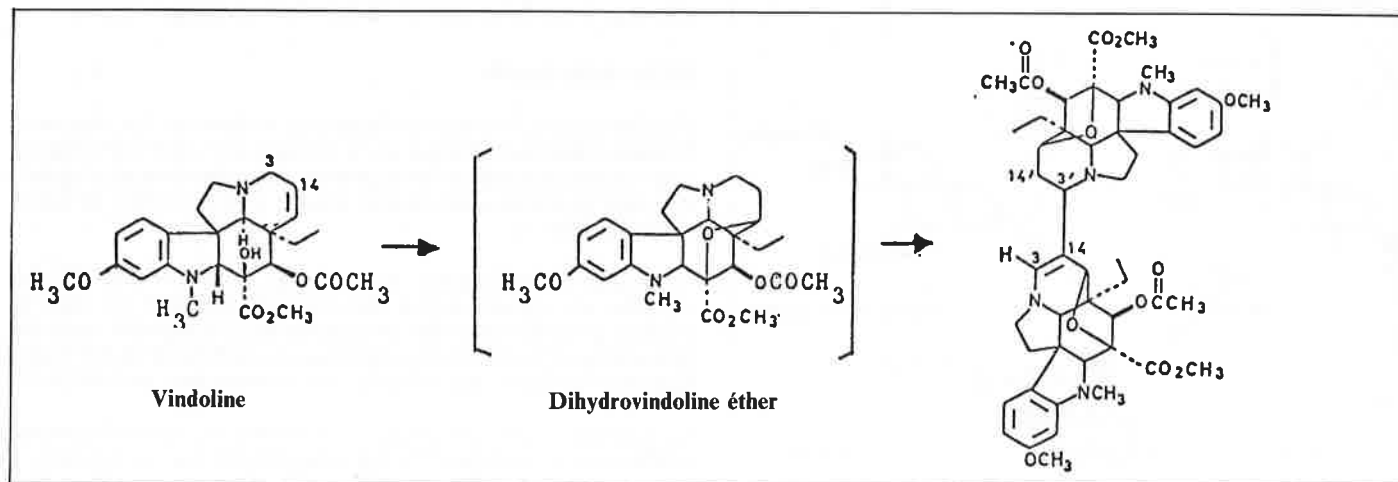
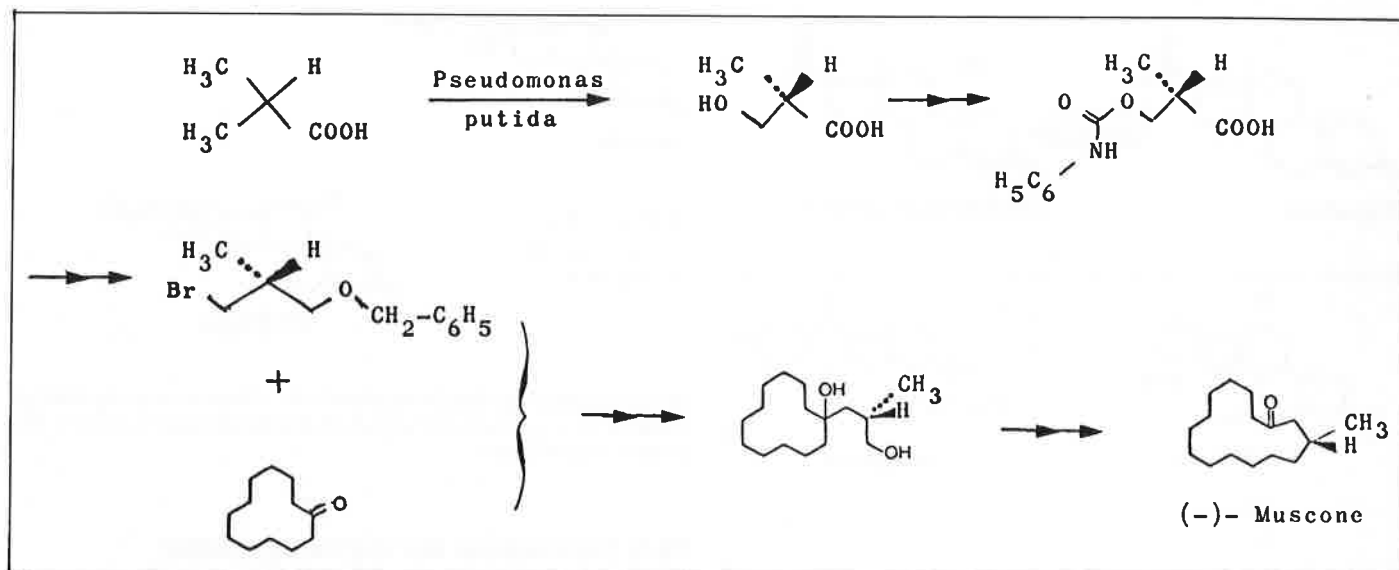


Cet acide est ensuite transformé en uréthane puis en éther benzilyque bromé, en vue de son insertion sur la cyclododécanone, au niveau du carbonyle.

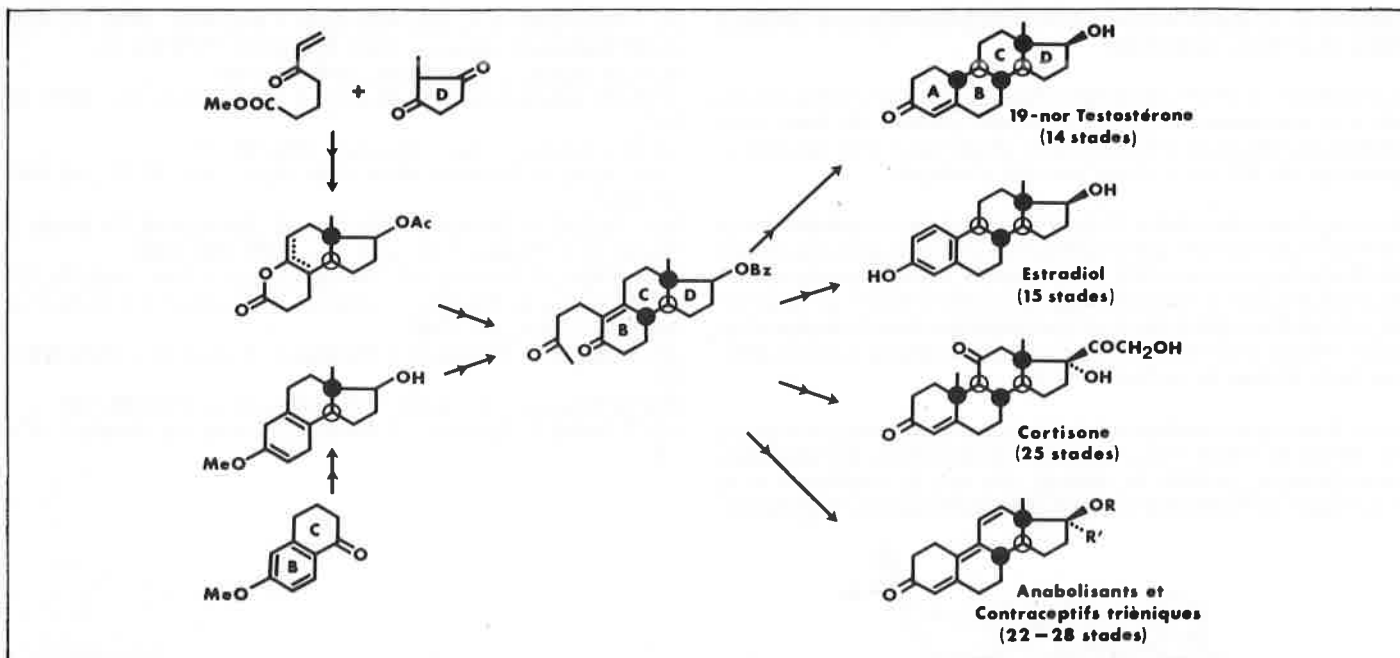
Six étapes seront ensuite nécessaires pour aboutir à la (R)-(-)-muscone.

III.4. Couplage carbone-carbone

Une réaction microbologique originale, récemment obtenue en série indolique, présente un double intérêt, aux plans de la recherche chimique et de l'investigation thérapeutique. Il s'agit de la première



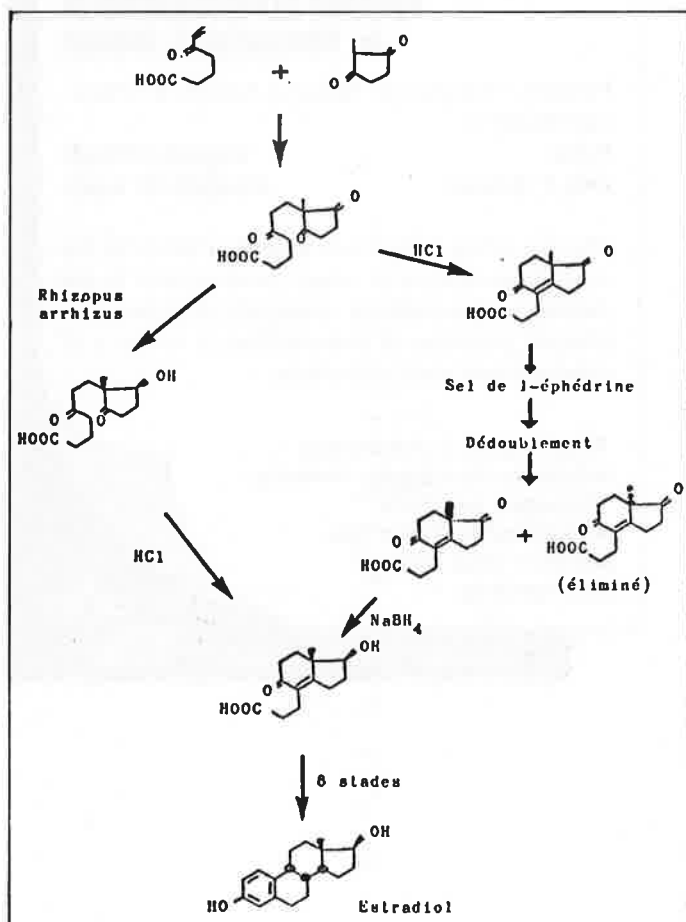
Dimérisation (C-C couplage) de la vindoline par *Streptomyces griseus*



Synthèse totale de stéroïdes (schéma général simplifié)

De très nombreux schémas de synthèse totale des stéroïdes ont été proposés. L'un d'eux utilise comme matière première la cyclopentane dione, précurseur du cycle stéroïdien D (10). Il exige pour aboutir à l'hormone féminine (estradiol) une quinzaine de stades au cours desquels intervient un dédoublement de racémate. Or on sait qu'un

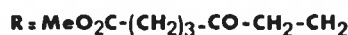
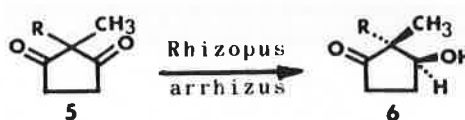
dédoublement classique en isomères droit et gauche s'accompagne d'une perte importante lorsque l'un des isomères est inutilisable; cette perte est d'autant plus lourde que la synthèse est plus longue et que le dédoublement est effectué à un stade tardif sur une structure en grande partie élaborée.



C'est pourquoi, dès les premières étapes d'une synthèse multistade, on doit s'efforcer de bâtir des centres d'asymétrie moléculaire dans l'orientation indispensable pour obtenir les effets biologiques désirés. L'utilisation des micro-organismes trouve une application de choix lorsque l'on s'adresse à des substances comme la méthylcyclopentane dione qui possède un centre prochiral.

La synthèse chimique de l'estradiol à partir de la méthylcyclopentanedione comporte un premier intermédiaire dont le traitement chimique impose, après cyclisation en milieu acide, un dédoublement en 3 stades pour obtenir l'isomère actif.

Une réaction microbiologique sur le même intermédiaire s'avère ici particulièrement avantageuse *Rhizopus arrhizus* réduit sélectivement un seul des carbonyles et le groupe hydroxyle est formé dans l'orientation souhaitée (11).



Mieux encore le groupe méthyle angulaire voisin prend *ipso facto* la configuration B. L'emploi du micro-organisme permet donc, en stade unique, la création de deux centres d'asymétrie de l'estradiol. De plus le rendement de la réaction est supérieur à 70%.

III.3.b. Série macrocyclique

Cet exemple concerne la synthèse d'une cétone, matière précieuse pour l'industrie des parfums: la (R) (-)-muscone ou 3 α -méthylcyclopentadécaneone.

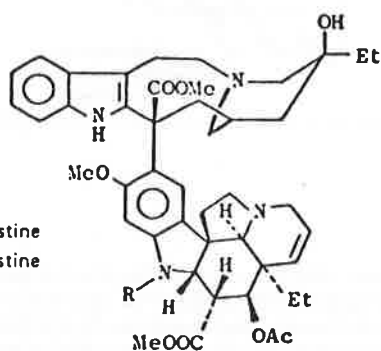
Synthèse totale de l'estradiol

réaction de couplage carbone-carbone expérimentalement réalisée à l'aide d'un micro-organisme.

La structure de divers alcaloïdes complexes des Pervenches, résulte de la condensation biogénétique carbone-carbone de deux bases indoliques également présentes dans ces plantes. Cette réaction de couplage est difficile à réaliser par voie chimique.

Les chercheurs de la firme Eli Lilly sont parvenus à condenser deux molécules de vindoline par incubation de cette base dans une culture de *Streptomyces griseus* (13), le champignon inférieur producteur de la streptomycine. L'opération s'effectue en deux stades. La structure de la vindoline subit d'abord un réarrangement avec formation d'un éther interne, puis deux molécules ainsi réarrangées sont couplées par leurs atomes de carbone 3' et 14.

Cette réaction de couplage est identique à celle qui, dans les tissus de la pervenche *Vinca rosea*, conduit à la formation des alcaloïdes improprement qualifiés de dimères, tels que la vinblastine et la vincristine, qui bénéficient de propriétés antitumorales importantes.



- 1 R = CHO vincristine
2 R = CH₃ vinblastine

La « dimérisation » par couplage carbone-carbone n'est donc pas un processus biogénétique réservé aux végétaux supérieurs. Sa réalisation par voie microbiologique ouvre des perspectives de développement en vue de la préparation de substances dont l'intérêt thérapeutique est évident.

Conclusion

Avec la participation des micro-organismes aux grandes synthèses multistades, l'utilisation rationnelle de systèmes enzymatiques comme réactifs chimiques est entrée dans la pratique industrielle. Par ailleurs, la découverte de nombreux mécanismes de biosynthèses complexes oriente l'organicien vers une méthodologie inspirée de celle de la Nature.

Cette évolution devrait conduire à l'élaboration de synthèses multistades continues, évitant l'isolement classique des intermédiaires, comme cela se passe chez les êtres vivants. Les premières applications des recombinaisons génétiques permettent déjà une approche de ce problème considérable.

Bibliographie

(1) L. Penasse, Les enzymes : cinétique et mécanisme d'action, Masson et Cie éd., 1974.

- (2) T. Reichstein et A. Grussner, *Helv. Chim. Acta.*, 1934, **17**, 311.
 (3) M. Kuhlanek, *Advances Appl. Microbiol.*, 1970, **12**, 11.
 (4) L. H. Sarett, *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 601.
 (5) D. H. Peterson et H. C. Murray, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1871.
 (6) W. Charney, *J. Appl. Bacteriol.*, 1966, **29**, 93.
 (7) G. Anner et Miescher, *Helv. Chim. Acta.*, 1948, **31**, 2173 et 1949, **32**, 1957.
 (8) L. Velluz, G. Nominé, J. Mathieu, E. Toromanoff, D. Bertin, J. Tessier et A. Pierdet, *C.R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 1084.
 (9) L. Velluz, G. Nominé et J. Mathieu, *Angew. Chem.*, 1960, **72**, 725.
 (10) L. Velluz, G. Nominé, G. Amiard, V. Torelli et J. Cerede, *C.R. Acad. Sci.*, 1963, **257**, 3086.
 (11) P. Bellet, G. Nominé et J. Mathieu, *C.R. Acad. Sci.*, 1966, **163 C**, 88.
 (12) Q. Branca et A. Fischli, *Helv. Chim. Acta.*, 1977, **60**, 925.
 (13) T. Nabih, L. Youel et J. P. Rosazza, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1978, 757.

Reviews of Chemical Intermediates

Volume 2
No. 4/1979

An International Journal

Formerly "Reviews on Reactive Species in Chemical Reactions".

Editor
Otto P. Strausz

Assistant Editor
Elizabeth M. Lown

The aim of the journal is to provide a forum for the rapid dissemination of recent developments in the chemistry, spectroscopy, molecular structure, and physical properties of intermediates in all areas of chemistry and allied disciplines.

1980 Volume 3. Publication
schedule: four issues annually,
100 pages per issue.
Annual subscription rate
DM 95,— plus postage
and handling.

P. O. Box 1260/1280, D-6940 Weinheim

verlag
chemie