

Des champignons et des hommes

La pénicilline

J.J.Sanglier

La Pénicilline est le premier antibiotique développé industriellement. Il est produit par un champignon microscopique.

L'histoire de la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming est la plus connue des découvertes accidentelles. Beaucoup a été écrit à ce sujet, parfois à la limite de l'affabulation.

Plusieurs faits importants sont à mettre en évidence : avant Fleming divers chercheurs avaient décrit des phénomènes d'antibiose, Fleming avait découvert le lysozyme avant la pénicilline, ce sont d'autres chercheurs qui ont effectué les travaux essentiels pour la purification chimique et le développement thérapeutique de la pénicilline.

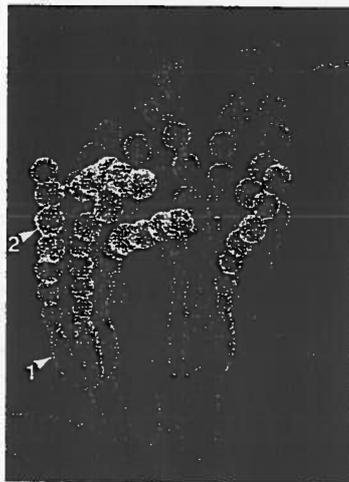
Il existe des documents indiquant que dans l'Antiquité, pour soigner des infections, les Egyptiens et les Romains utilisaient des champignons se développant sur le pain. Les Chinois, il y a 3000 ans, semblent avoir utilisé des graines de soya infectées par des champignons pour traiter des infections cutanées. Des indications sur l'utilisation de champignons comme agents thérapeutiques se retrouvent dans le Talmud et dans plusieurs livres de médecine populaire en Europe et en Amérique, par exemple dans celui de J.Parkinson (1760). Bien sûr, il existe tant de moisissures poussant sur le pain ou les grains, et la plupart produisent d'ailleurs des mycotoxines qu'il n'est pas possible de tirer des conclusions scientifiques. Le vrai point de départ est la culture en laboratoire de microbes vers 1870. A partir de cette date, diverses observations sur les propriétés antibiotiques de micro-mycètes, en particulier d'espèce de bactéries se poursuivent. J. époque l'activité antibiotique 1871, J. Lister, un chirurgien, utilisa des préparations de Pen-trouva confronté à l'instabilité en 1874, décrit également les tains champignons contre des et Joubert observent l'inhibi-par des bactéries non identi-effets antagonistes récipro-champignons. Cantoni en ce phénomène d'antibiose Quatre ans plus tard le myco-lise pour la première fois le finition moderne est ensuite (antagonisme d'un microor-sieurs autres). Durant les an-sais cliniques furent effectués des lactobacilles pour com-naux. A partir d'une culture de



Sir Alexandre Fleming (1954)
(Photo du St Mary's Hospital)

ces du genre *Penicillium*, et B. Sanderson observe à cette de certains *Penicillium*. En nota aussi ce phénomène et nicillium *glaucom* mais se du principe actif. W. Roberts, pouvoir antagoniste de cer-bactéries. Peu après, Pasteur tion du bacille de l'anthrax fiées. J. Tyndall remarque les ques des bactéries et des 1885 formula l'idée d'utiliser comme voie thérapeutique. logue français Vuillemin uti-terme "antibiose" dont la dé-donnée par M. Ward en 1899 ganisme contre un ou plu-nées suivantes, plusieurs es-avec des bactéries, comme battre des pathogènes intesti-*Penicillium*, B. Gosio isole,

en 1896, une substance d'une souche de *Penicillium*, qui sera plus tard déterminée comme étant l'acide mycophénolique, mais l'activité antibiotique de ce composé se révèle faible. L'année suivante le Français E. Duchesne décrit, dans sa thèse de doctorat, l'atténuation chez l'animal d'infections expérimentales de bactéries coliformes et typhoidiques par l'inoculation simultanée de *Penicillium glaucum*. Ce visionnaire emploie pour la première fois le terme pénicilline mais en latin et déclare que "grâce à des études plus poussées, on arrivera à la découverte d'autres faits directement utiles et applicables à l'hygiène prophylactique et à la thérapie". Hélas, comme Lister, Duchesne ne publie pas ses résultats dans une revue scientifique. En 1899, R. Emmerich, professeur d'hygiène à l'université de Munich, développe une préparation, à partir de *Pseudomonas pyocyanea*, dénommée pyocyanase qui sera l'objet de plusieurs essais cliniques avant sa mise en vente pendant plusieurs années. Mais est-ce le produit bactérien ou l'agent de conservation, le phénol, qui fut réellement actif ? Tartakovskii, en 1903, puis A. Surli notent l'effet inhibiteur d'extraits de *Penicillium glaucum* sur cer-



Souche de *Penicillium chrysogenum*
1 - Phyalide ; 2 - Spore (photo en
microscope électronique à balayage)

montre que l'*Aspergillus fumigatus* "bacille" de la tuberculose et berculeux, mais probablement et l'application de sa méthode Alsberg et Black isolent l'acide biteur de "*Bacterium coli*".

tains bacilles. Vaudramer, en 1912, gatus peut inhiber la croissance du proclame avoir traité deux cents tu-avec un taux de succès très variable ne fut jamais étendue. En 1913, pénicillinique de *P. puberulum*, inhi-Cette longue liste n'est pas exhaus-par plusieurs scientifiques sur la pour combattre des germes patho-furent pas intensément poursuivies tées. Le potentiel de l'antibiose Si *P. glaucum* est rapporté dans la sur l'effet antibiotique de micro-toutefois qu'il s'agisse de sou-espèces de ce genre. Parallèle-poursuivis pour découvrir des contre des germes pathogènes.

plupart des observations mycètes, il est probable ches appartenant à diverses ment, des efforts se sont produits chimiques actifs En 1891, P. Ehrlich, un chimiste allemand, démontre l'activité du bleu de méthylène sur l'agent de la malaria mais le produit n'offre pas d'avantage par rapport à la quinine. Le bactériologiste Thomas décrit, au début de ce siècle, l'efficacité de l'atroxyle (arséinate de sodium) sur les trypanosomes. Un jeune chercheur japonais, Hata, dans le laboratoire d'Ehrlich, découvre en 1909 l'action du salvarane contre les *Treponema* (notamment agents de la syphilis). Jusqu'en 1932, peu de progrès sont effectués en chimiothérapie.

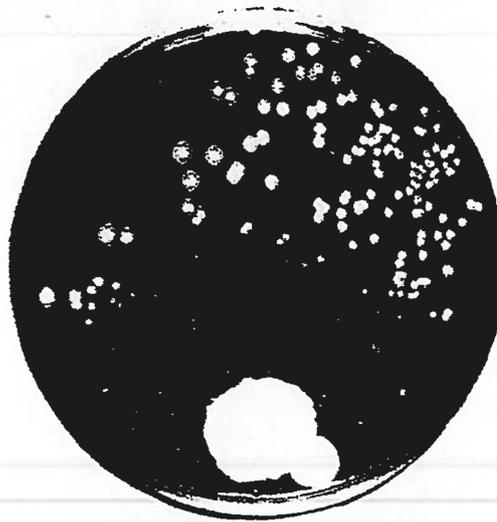
A partir de 1920, la situation dans le combat des maladies infectieuses piétine. A l'exception de la quinine contre la malaria et des dérivés arséniques pour la syphilis et la maladie du sommeil, la chimiothérapie ne se révèle guère prometteuse car les produits se montrent trop toxiques. Si l'antibiose a suggéré une utilisation de substances naturelles pour combattre des germes pathogènes, son application est confrontée aux difficultés d'extraction des substances actives et à l'instabilité de plusieurs d'entre elles.

Sir A. Whright, du St Mary's Hospital de Londres, fut une des figures les plus marquantes de la recherche médicale des années 1920 et il servit même de prototype au héros de la pièce de G.B. Shaw "*The Doctor's dilemma*". Son objectif principal était de trouver des voies renforçant nos défenses propres contre les infections. Il reçut le support de plusieurs jeunes scientifiques dont L. Colebrook et A. Fleming (1881-1955).

A. Fleming est né à Ayrshire, dans la campagne écossaise, en 1881. A. Fleming n'a que sept ans quand son père meurt, laissant sa femme seule pour s'occuper de la ferme et des quatre enfants. A seize ans, il va à Londres rejoindre son frère aîné, commence des études à l'école polytechnique mais doit les arrêter faute de moyens. Il travaille un certain temps dans une compagnie d'expédition. Quelques années plus tard, à la suite d'un petit héritage, son frère l'encourage à entreprendre des études de médecine. Son choix se porte sur le St. Mary's Hospital qu'il connaissait pour avoir joué avec une équipe écossaise au water polo contre l'équipe de cet hôpital. Il voulut tout d'abord devenir chirurgien mais après avoir obtenu son diplôme de médecine, il se voit offrir un poste dans le laboratoire de Whright. Il travaillera dans ce laboratoire jusqu'à la fin de sa carrière, devenant professeur de bactériologie en 1929. Il se trouve donc dans un environnement idéal.

En 1922, Fleming découvre par hasard, dans les sécrétions nasales et dans les larmes, une substance qui lyse certaines bactéries mais pas les leucocytes et qu'il dénomme lysozyme. Il poursuivra des recherches sur cette protéine mais n'ayant pas de formation de chimiste et n'ayant pas de support dans cette discipline il ne pourra la caractériser.

Ce travail se réalisera à Oxford dans le laboratoire de H.W. Florey et de ses collaborateurs qui joueront par la suite un rôle capital dans l'histoire de la pénicilline. Cette découverte d'un facteur lytique se révèle prépondérante dans la découverte de la pénicilline, même si le lysozyme se révèle inactif contre la plupart des pathogènes. En été 1928, Fleming effectue des recherches sur la grippe et le rhume. A son retour de vacances, il note dans une boîte de Pétri une contamination fongique qui inhibe la croissance de bactéries. Il détermine que s'agit d'un *Penicillium notatum*, puis ultérieurement dénommée *P. chrysogenum*. Il démontre que la substance est active contre toute une gamme de bactéries et la dénomme pénicilline. Il publie ses observations en 1929 dans le "British Journal of Experimental Pathology", pensant que l'ac-tion de la pénicilline est du même type que celle du lysozyme. Ses collaborateurs, Craddock et Ridley, tentent en vain d'isoler la substance. Fleming montre peu d'intérêt à une application thérapeutique et utilise



La fameuse boîte de pétri de Fleming montrant le *Penicillium* inhibant la croissance de colonies de *Staphylococcus aureus* (photo du St Mary's Hospital)

de ce *Penicillium* pour fabriquer des milieux sélectifs. Cependant quelques essais thérapeutiques sont effectués. Son collaborateur Craddock essaie sans succès de traiter par ce "jus" une infection nasale chronique. Un jeune étudiant du groupe est par contre traité avec succès d'une conjonctivite due à des pneumocoques. C.G. Paine, un ancien étudiant du St. Mary's Hospital, travaillant à la Royal Infirmary à Sheffield, obtient, en 1932, le champignon de Fleming et effectue quelques essais cliniques. Le développement de la pénicilline sommeille ensuite jusqu'à la fin des années 1930. La découverte de Fleming n'intéresse pas grand monde. Fleming recherche d'autres microorganismes producteurs d'antibiotiques mais il ne publiera pas ses travaux.

Pendant ce temps, la découverte de l'activité antibactérienne du Prontosil par G. Domagk, en 1932, puis d'une partie de cette molécule, dénommée sulfanilamide, par J. Tréfouel et ses collègues à l'Institut Pasteur révolutionnent la chimiothérapie.

En 1928, Fleming effectue des recherches sur la grippe et le cancer, il note dans une boîte de Pétri une contamination fongique qui inhibe la croissance de bactéries. Il détermine que s'agit d'un *Penicillium notatum*, puis ultérieurement dénommée *P. chrysogenum*. Il démontre que la substance est active contre toute une gamme de bactéries et la dénomme pénicilline. Il publie ses observations en 1929 dans le "British Journal of Experimental Pathology", pensant que l'action de la pénicilline est du même type que celle du lysozyme. Ses collaborateurs, Craddock et Ridley, tentent en vain d'isoler la substance. Fleming montre peu d'intérêt à une application thérapeutique et utilise

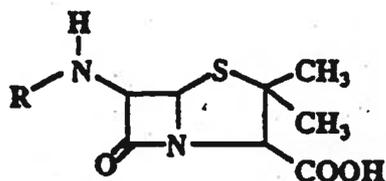
Une recherche systématique de substances produites par des microorganismes est poursuivie par R. Dubos (un élève de S. Waksman qui découvrira par la suite la streptomycine) et son équipe à l'institut de recherche médicale Rockefeller à New-York. Il découvrira ainsi la thyrothricine en 1939. La thyrothricine est en fait le premier antibiotique déclaré comme substance thérapeutique, mais trop toxique elle ne pourra être utilisée que pour des infections externes. Waksman s'intéresse de plus en plus aux antibiotiques synthétisés par des actinomycètes. La puissance thérapeutique de la pénicilline ne sera mise en évidence qu'aux débuts des années 1940. Suite naturelle de leurs travaux sur le lysozyme, le groupe d'Oxford conduit par H. Florey (1898-1968) et auquel appartient notamment le chimiste E. Chain (1906-1979), s'attaque au problème du rôle des antibiotiques. Ils choisissent, en 1938, plusieurs orientations de recherche: les produits de souches de *Bacillus subtilis*, de *Pseudomonas pyocyanea* et de *Penicillium notatum*, la souche de Fleming. Les travaux de Dubos et Waksman attirent l'attention de l'équipe de Florey. Ils se concentrent alors sur la pénicilline. Les travaux chimiques de Raistrick, qui participera plus tard à la découverte de la patuline et de la griséofulvine, leur servent de base. Les travaux d'extraction se révèlent longs et pénibles; le produit étant instable, l'extraction est réalisée à 4°C. Par rapport aux scientifiques précédents, ils eurent la possibilité de lyophiliser les extraits, un procédé qui se révèle capital. L'aide du talentueux biochimiste N.G. Heatley fut déterminante. Le premier extrait est testé sur des souris le 25 mai 1940. Il est actif bien que la concentration en pénicilline ne soit encore que de 1%. Par chance aucune des substances formant les 99% restant ne se montre toxique. Ils décident de produire la pénicilline en plus grande quantité ce qui se révèle très difficile dans cette période de guerre. L'équipe reçut l'aide d'un chimiste supplémentaire, E. Abraham. Ces chercheurs parvinrent quand même à produire suffisamment de pénicilline pour leurs premiers essais sur l'homme. Une des étapes décisives fut l'utilisation d'une nouvelle technique, la chromatographie par adsorption. Le premier article de l'équipe "Lancet" en 1940. Fleming vient rendre, en septembre 1940, visite à Florey et obtient un échantillon de pénicilline avec lequel il fera un essai thérapeutique cou-



Lord Howard Florey (peint par C. Deane)

ronné de succès. Après un trop malade, l'utilisation de la pénicilline en thérapie humaine par l'équipe d'Oxford voit ses premiers succès. En 1941, paraît un second article publiant des résultats cliniques. Florey et Hardley quittent pour les Etats-Unis l'Angleterre où les conditions de travail sont devenues trop dures. Hardley poursuit ses travaux à Peoria, dans le département fédéral de l'agriculture où existait une expérience remarquable dans la culture de microorganismes. On y découvre que le "corn steep liquor" (liqueur de trempage du maïs) est un nutriment idéal pour le *Penicillium* et surtout augmente considérablement la production de pénicilline. En parallèle à ce programme physiologique, se poursuit un criblage d'autres souches de *Penicillium* dans l'espoir de découvrir un meilleur producteur et un programme de mutation/sélection démarre. Une contribution importante fut faite par une dame de Peoria, M. Hunt, surnommée "Moldy Mary" (mold = champignon) pour son enthousiasme à chercher de nouvelles souches fongiques. Elle rapporte du marché un melon infecté par un champignon qui a un bel aspect jaune. La souche isolée produit plus du double de pénicilline que la souche de Fleming. Rapidement, on passe de 2 unités de pénicilline par litre à 900, puis les progrès se poursuivront sans arrêt jusqu'à nos jours. Durant

la guerre, les recherches sur les techniques de production, sur la formule, et sur la synthèse chimique sont interdites de publication. Les informations circulent en grand secret entre Anglais et Américains sous le nom de code "Pen". Initialement, la production de pénicilline était réalisée en culture stationnaire, et des milliers de boîtes de Roux furent ainsiensemencées. Une étape importante fut la mise au point du procédé en culture liquide agitée.



Pénicilline G 

Pénicilline V 

Après les premiers succès, plusieurs firmes pharmaceutiques aux Etats-Unis et en Grande-Bre-

tagne s'intéressent à la pénicilline et vont la produire en grandes quantités dès 1943.

La détermination de la structure de la pénicilline sera un des premiers succès de la cristallographie en rayons X. La synthèse chimique ne sera réalisée que plusieurs années après et ne sera jamais industriellement rentable, démentant certains experts qui considéraient que la production fermentaire de la pénicilline serait un échec.

La pénicilline va sauver la vie de milliers de soldats puis de millions de personnes. Pendant la guerre, avant l'utilisation de la pénicilline, soldats et civils meurent d'infection par milliers. Les grandes tueuses sont des bactéries qui pénètrent dans les plaies et provoquent une infection généralisée, notamment la mortelle gangrène gazeuse. A la fin de la guerre, l'utilisation de la pénicilline sera généralisée.

nouveaux antibiotiques vont être développés. Le développement de la biotechnologie constituera la base de l'industrie de fermentation.

En 1945, Fleming, Florey et Chain reçoivent le prix Nobel et seront en étonnement que lorsqu'on pense directement à Fleming, on oublie les autres chercheurs ayant participé à sa découverte. Le soutien financier de St Mary's Hospital fut important pour son travail.



Sir Ernst Chain (1945). A gauche on aperçoit une colonne chromatographique pour la purification de la Pénicilline

La recherche pour de nouvelles pénicillines semi-synthétiques fut intensifiée. Ensuite se poursuivirent les futurs développements de la production moderne et de

et Chain reçoivent le prix Nobel. Il semble que lorsqu'on parle de pénicilline, on oublie les autres chercheurs ayant participé activement à sa découverte. St Mary's Hospital avait bénéficié et effectua une publication collaborative, A. Fle-

L'histoire de la pénicilline démontre qu'une découverte est souvent une imbrication d'observations précédentes, de travaux dans plusieurs laboratoires, de collaborations diverses. Elle met aussi en évidence l'importance de l'observation, qualité trop souvent négligée de nos jours. Lorsque Fleming reçoit le titre de commandeur de la Légion d'Honneur du général de Gaulle, il déclare " On a dit que j'avais inventé la pénicilline. Elle n'a jamais été inventée car elle est produite depuis des temps immémoriaux par une moisissure. Mon seul mérite est d'avoir rendu le monde attentif à cette substance."