

Chapitre 1. **Chronologie de la découverte et de l'étude des enzymes**

Les organismes vivants sont le siège d'un très grand nombre de réactions biochimiques très diverses¹. Ces réactions s'effectuent dans des conditions physico-chimiques (pression = 1 bar, température = 37 °C, pH = 7) telles que, sans l'intervention de certaines macromolécules, elles ne s'effectueraient pas dans une échelle de temps compatible avec les processus biologiques, donc avec la vie de la cellule.

Ces processus biologiques extrêmement complexes ont malgré tout lieu très rapidement (par exemple, les temps de génération d'organismes comme les bactéries sont de l'ordre de la dizaine de minute). En effet, les réactions biochimiques qui sont les éléments de base de ces processus sont catalysées par des macromolécules biologiques aux propriétés particulières : les enzymes.

Il est d'usage d'employer le féminin pour désigner l'entité enzyme.

Toutes les enzymes sont des protéines. D'autres types de molécules biologiques telles que les ribozymes (qui sont des ARN) ont des activités catalytiques. Ces types de molécules biologiques ne seront pas développés dans cet ouvrage. Le pouvoir de catalyse des enzymes résulte de leur séquence en acides aminés : celle-ci adopte un repliement dans l'espace qui est optimisé pour la très haute spécificité de reconnaissance des molécules sur lesquelles les enzymes agissent qu'on appelle les substrats (les molécules issues des réactions enzymatiques sont les produits).

Les enzymes :

- sont ubiquitaires dans le monde vivant (virus, bactéries, eucaryotes) et sont présentes dans tous les organismes.
- interviennent dans tous les processus biologiques et dans tous les compartiments subcellulaires des eucaryotes.
- adoptent un très grand nombre de repliements du fait d'une très grande diversité de composition en acides aminés.
- catalysent un très grand nombre de réactions biochimiques (environ 5 000 sont recensées dans la base de données BRENDA-<https://www.brenda-enzymes.org/>).

1 Pour illustration, voir la vue d'ensemble des voies métaboliques sur : <http://biochemical-pathways.com/#/map/1>.

- sont très diverses du point de vue des mécanismes catalytiques et de leurs modes de régulation.

L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes (la relation structure-fonction des enzymes). En particulier, l'enzymologie s'applique à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes.

1. Les premiers pas

Sur le plan chronologique, on ne peut pas situer exactement la découverte de la notion d'enzyme et surtout d'enzyme en tant que seul catalyseur des réactions chimiques qui se déroulent dans les organismes vivants (les réactions biochimiques).

1783 : Lazzaro Spallanzani (1729-1799) a rapporté que la viande est liquéfiée par un extrait gastrique. Il a noté également que la température a un grand effet.

1814 : Constantin Kirchhoff (1764-1833) observa qu'un composant « glutineux » (comme il l'appela à l'époque) de blé convertit l'amidon en sucre. Il conclut qu'au cours de la germination, le gluten transforme l'amidon en sucre.

1833 : La première découverte d'une enzyme est d'habitude attribuée à Anselme Payen (1795-1871) et Jean-François Persoz (1808-1868) qui ont traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol puis précipité une substance labile à la chaleur qui hydrolyse l'amidon. Ils ont appelé cette fraction « diastase » (« séparation » en Grec) puisque cette fraction sépare le sucre soluble de l'amidon insoluble. On sait maintenant que cette préparation était une solution non purifiée d'amylase. L'amylase est une enzyme qui hydrolyse l'amidon et le glycogène.

1834 : Theodor Schwann (1810-1882) a obtenu le premier un agent actif d'origine animale (la pepsine) qu'il a partiellement purifié en traitant la paroi stomacale par l'acide. Il est important de souligner qu'à l'époque les premières observations d'une activité enzymatique ont précédé une notion claire et précise de la catalyse. Le concept de catalyse provient de l'observation de l'action de la diastase et de la pepsine parallèlement à celle de la levure pendant la fermentation : dans tous les cas, une « *substance était changée en une autre* » sous l'influence d'un agent actif : le catalyseur. À l'époque, la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) n'était pas encore considérée comme une cellule vivante.

1838 : Charles Cagniard de Latour (1777-1859) montra que le processus de fermentation alcoolique est dû à un organisme vivant : la levure de bière.

1858 à 1871 : Les travaux de Louis Pasteur (1822-1895) confirmèrent cette idée. Louis Pasteur émit l'hypothèse révolutionnaire que les changements chimiques lors de la fermentation (qui ne nécessite pas de dioxygène) résultent des processus de la vie au sein des levures impliquées dans la fermentation.

À l'opposé, Justus von Liebig (1803-1873) privilégiait une théorie purement chimique : un « ferment » était une substance chimique produite par un organisme en décomposition et les atomes de ce ferment étaient supposés en mouvement incessant. Cet état d'agitation élevé était transmis aux atomes de la molécule de sucre (substrat du ferment) dont les éléments devaient être maintenus par des forces faibles. Il en résultait une scission du sucre en dioxyde de carbone (CO₂) et éthanol dont les liaisons sont plus fortes.

1860 : Marcellin Berthelot (1827-1907) fit macérer de la levure et obtint une fraction précipitable à l'alcool dont une petite quantité était capable de convertir le saccharose en glucose plus fructose. Il conclut que l'invertase (nom qu'il donna à l'agent actif de cet extrait – le sucre inverti est le mélange glucose/fructose après hydrolyse du saccharose) est l'un des multiples ferments présents dans la levure. L'invertase est la β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26, voir le chapitre 2 pour la classification des enzymes selon la commission internationale, « *Enzyme Commission* »). Cette observation renchérit l'hypothèse d'une catalyse chimique.

1876-1877 : Wilhelm Kühne (1837-1900) mit en évidence la trypsine dans le liquide pancréatique de l'intestin de bœuf au cours de ses études sur la digestion intermédiaire des protéines dans le tractus gastro-intestinal. Il conclut que la trypsine est initialement inactive puis convertie en sa forme active. Cette observation est à la base de la notion de précurseur inactif des protéases que l'on appelle zymogène et de l'activation de ce zymogène par (auto)protéolyse (voir le chapitre 3 sur les protéases).

1878 : Wilhelm Kühne proposa le nom d'enzyme (« *en-* » et « *zumê* », signifiant « dans le levain ») pour qualifier ces ferments. L'addition du suffixe « *ase* » au nom du substrat d'une enzyme pour dénommer cette enzyme fût proposée par Emile Duclaux (1840-1904) en 1898.

1897 : Martin Hahn (1865-1934), assistant de Hans Buchner (1850-1902), tentait d'isoler des protéines de levure en broyant ces levures avec du sable fin et de la terre de diatomées. Cependant, cette préparation d'extrait de levure se conservait mal.

Eduard Buchner (1860-1917) s'intéressait aussi aux extraits de levure dans un but thérapeutique. Ces extraits étant destinés à l'homme ne pouvaient pas contenir des bactéricides. Le sucre permettant de conserver les fruits, il proposa d'ajouter du saccharose à l'extrait de levure pour le conserver. Il observa que l'adjonction de sucre entraînait la formation de bulles de gaz carbonique (CO₂) dans le mélange. Le point important fût de vérifier qu'il n'y avait présence d'aucune cellule ou débris membranaires dans les extraits de levure.

En publiant ses observations, Eduard Buchner conclut : « *La complexité de la levure n'est pas indispensable au déroulement de ce processus. Le ferment actif du jus n'est probablement qu'une substance dissoute, sans aucun doute une protéine : nous la baptiserons zymase.* ». Pour cette découverte, Eduard Buchner reçut le Prix Nobel en 1907.

La démonstration fût ainsi faite que la fermentation n'est pas le résultat de « principes occultes vitaux » mais celui d'une succession de réactions biochimiques contrôlées par des catalyseurs biologiques contenus dans les cellules. On sait maintenant que la « zymase » des extraits de levure obtenue par Eduard Buchner est en fait un mélange des enzymes qui catalysent les réactions de la glycolyse.

1897 : La même année, Gabriel Bertrand (1867-1962) observa que certaines enzymes requièrent des facteurs dialysables pour leur activité. Il les nomma coenzymes.

En effet, de nombreuses enzymes nécessitent d'autres composés (des cofacteurs) pour être actives. Le complexe actif est appelé holoenzyme : il est constitué de l'apoenzyme (l'enzyme) et du cofacteur (un coenzyme, un groupe prosthétique ou un ion métallique activateur).

Toutes les enzymes connues sont des protéines. Elles sont donc constituées d'un enchaînement d'acides aminés. Cette séquence est à l'origine des propriétés physico-chimiques remarquables des enzymes (des protéines en général). Elle est aussi l'origine de la relation entre la structure (ou plus précisément l'ensemble des conformations) qu'adopte la chaîne polypeptidique et les propriétés fonctionnelles des enzymes.

Remarque : les ribozymes sont des macromolécules biologiques qui possèdent également une activité catalytique. Cependant, ce sont des molécules d'ARN distinctes des enzymes.

2. Le xx^e siècle

Au début du xx^e siècle, de gros efforts furent fournis pour purifier des enzymes, élucider les voies métaboliques et décrire l'activité catalytique des enzymes en termes mathématiques.

1901 : Franz Hofmeister (1850-1922) proposa l'idée que chaque réaction du métabolisme est catalysée par une enzyme distincte. Il proposa également que les polypeptides sont constitués d'acides aminés reliés par une liaison peptidique.

1902 : Victor Henri (1872-1940) et Adrian Brown (1852-1919) suggèrent indépendamment que la formation d'un complexe enzyme-substrat est un intermédiaire obligatoire de la réaction enzymatique. Cette suggestion s'appuyait sur la forme de la courbe (dite de saturation) obtenue quand on reporte la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Adrian Brown avait étudié la vitesse d'hydrolyse du sucrose par la β -fructofuranosidase, l'invertase de la levure. De plus cette suggestion était en accord avec le concept de reconnaissance enzyme-substrat du type « clé-serrure » (voir le chapitre 2) proposé par Emil Fischer (1852-1919) en 1894.

1910 : Équation de Hill développée par Archibald Hill (1886-1977, Prix Nobel en 1922) pour décrire la courbe en forme de sigmoïde de fixation du dioxygène sur

l'hémoglobine. De manière générale, elle décrit la saturation d'une protéine par un ligand en fonction de la concentration de ce ligand.

Victor Henri fût le premier à décrire l'équation mathématique reliant l'effet de la concentration du substrat à la vitesse de catalyse par une enzyme.

1913 : Leonor Michaelis (1875-1949) et Maud Menten (1879-1960) redécouvrirent l'équation de Victor Henri et établirent la relation connue sous le nom d'équation de Henri-Michaelis-Menten. Le point important est que l'obtention de cette équation repose sur l'hypothèse qu'il s'établit un équilibre rapide entre les concentrations de l'enzyme, du substrat et du complexe enzyme-substrat ($E + S \rightleftharpoons ES$). C'est l'hypothèse du quasi-équilibre (voir le chapitre 4).

1925 : George Briggs (1893-1985) et James Haldane (1892-1964) généralisèrent l'équation précédente en introduisant le concept d'état stationnaire pour la concentration du complexe enzyme-substrat (ES). C'est l'hypothèse de l'état stationnaire de la concentration du complexe ES (voir le chapitre 4).

Le fait que les enzymes sont des protéines ne fût accepté qu'à partir de la fin des années 1920. De nouvelles techniques chimiques et physiques furent employées pour analyser la structure des protéines. En 1926, James Sumner (1887-1955) cristallisa l'uréase, puis il isola la catalase en 1937 (Prix Nobel en 1946). John Northrop (1891-1987 / Prix Nobel en 1946) et ses collaborateurs cristallisèrent le pepsinogène, la pepsine, plusieurs isoformes de la trypsine et de la chymotrypsine et la carboxypeptidase et démontrèrent la pureté des cristaux obtenus.

Des années 20 aux années 50, des centaines d'enzymes furent purifiées et cristallisées, permettant ainsi l'élucidation de nombreuses voies métaboliques :

La glycolyse ou voie Embden-Meyerhof-Parnas	Gustav Embden (1874-1933), Otto Meyerhof (1884-1951), Jakub Parnas (1884-1949)
Le métabolisme du glycogène	Gerty Cori (née Radnitz; 1896-1957), Carl Cori (1896-1984)
Le cycle de Szentgyörgyi-Krebs	Albert Szent-Györgyi (1893-1986), Hans Adolf Krebs (1900-1981), Hans Kornberg (1928-)
Le métabolisme des acides gras et la régulation du cholestérol	Feodor Lynen (1911-1979), Konrad Bloch (1912-2000)
Le cycle de Calvin-Benson-Bassham	Melvin Calvin (1911-1997), Andrew Benson (1917-2015), James Bassham (1922-2012)
La voie des pentoses phosphates ou voie de Warburg-Dickens-Horecker	Otto Heinrich Warburg (1883-1970), Frank Dickens (1899-1986), Bernard Horecker (1914-)
La voie Entner-Doudoroff	Nathan Entner (1920-), Michael Doudoroff (1911-1975)
La régulation des voies métaboliques par les protéines kinases et la phosphorylation par l'adénosine triphosphate	Principalement: Edwin Gerhard Krebs (1918-2009), Edmond Fischer (1920-)
Autres voies métaboliques : le cycle du glyoxylate, la glycogénogenèse, la néoglucogenèse, ...	

L'identification des enzymes impliquées dans ces voies métaboliques et l'élucidation des réactions qu'elles catalysent sont à l'origine de nombreux Prix Nobel (1922, 1931, 1937, 1947, 1953, 1961, 1964, 1992, ... liste non exhaustive).

1951-1953: Frédéric Sanger (1918-2013) publia la séquence complète en acides aminés de l'insuline, petite protéine de masse molaire 5 800 Da (premier Prix Nobel en 1958). Bien que l'insuline ne soit pas une enzyme, la technique de séquençage a été si importante (de même que l'ensemble des travaux de Frédéric Sanger), qu'il n'est pas inutile de mentionner cette étape.

1957-1959: La première structure d'une protéine par diffraction des rayons X fût obtenue par John Kendrew (1917-1997 / myoglobine) et Max Perutz (1914-2002 / hémoglobine), tous deux Prix Nobel en 1962.

Au cours des années 1960, les biochimistes focalisèrent aussi sur les mécanismes de l'activité enzymatique et sur leurs modes de régulation.

1958: Daniel Koshland (1920-2007) proposa le modèle de l'ajustement induit: le substrat induit un changement conformationnel du site actif de l'enzyme (voir le chapitre 2).

1963: Wallace Cleland (1930-2013) proposa une procédure claire et uniforme pour écrire les équations des cinétiques des systèmes enzymatiques à plusieurs substrats (voir le chapitre 6).

1965: Jacques Monod (1910-1976; Prix Nobel en 1965), Jeffries Wyman (1901-1995) et Jean-Pierre Changeux (1936-) proposèrent un modèle cinétique (modèle MWC) pour les enzymes allostériques (enzymes dont la courbe de vitesse en fonction de la concentration en substrat est une sigmoïde et non une hyperbole-voir le chapitre 7).

1966: Daniel Koshland (1920-2007), George Nemethy (1935-1994) et David Filmer généralisèrent le modèle précédent en incluant la notion d'ajustement induit proposée par Daniel Koshland (modèle KNF).

Au cours des années 1960 et 1970, la relation structure-fonction de plusieurs enzymes « archétypales » fût élucidée. Il s'agit principalement d'enzymes hydrolytiques (exemples: le lysozyme, la trypsine et la chymotrypsine, la ribonucléase A, ...) choisies en particulier parce qu'elles sont thermostables et facilement purifiables en grande quantité à partir du pancréas de bœuf.

L'exemple de la ribonucléase A illustre l'importance des résultats obtenus et des concepts généraux qui en ont découlé. Les études de la ribonucléase A ont conduit: (i) à la description de son mécanisme catalytique (1961); (ii) à la détermination de sa séquence en acides aminés (elle a été la première enzyme dont on a déterminé la séquence exacte, publiée en 1963); (iii) à l'élucidation de sa structure cristalline (1967, 1969); (iv) au décryptage du processus de son repliement.

Le Prix Nobel de chimie de 1972 a ainsi été décerné pour des travaux qui ont contribué à établir la relation structure-fonction des protéines :

- à Christian Anfinsen (1916-1995) pour avoir démontré le lien entre la séquence en acides aminés et la conformation biologiquement native-active de la ribonucléase. Cette conformation est la plus stable parce qu'elle a une énergie libre minimale.
- à Stanford Moore (1913-1982) et William Stein (1911-1980) pour avoir démontré le lien entre la structure chimique et l'activité catalytique du centre actif de la ribonucléase.

3. Années 1980 à nos jours

L'hypothèse de Christian Anfinsen, vérifiée pour un très grand nombre de protéines (notamment dites globulaires), est restée longtemps l'un des dogmes de la biologie. Cependant, à partir des années 1980, deux autres processus fondamentaux liés à l'acquisition de la forme native d'une chaîne polypeptidique ont été mis en évidence :

- Le processus impliquant les protéines dites « chaperonnes » (Ron Laskey, 1978 ; John Ellis, 1987). Ces protéines aident au repliement d'autres protéines ou les maintiennent dans la conformation native quand la cellule est soumise à certains stress. Parmi les protéines chaperonnes, on peut citer :
 - les protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein* ou HSP) ;
 - les chaperonines ;
 - les protéines LEA (*Late Abundant Embryogenesis*).

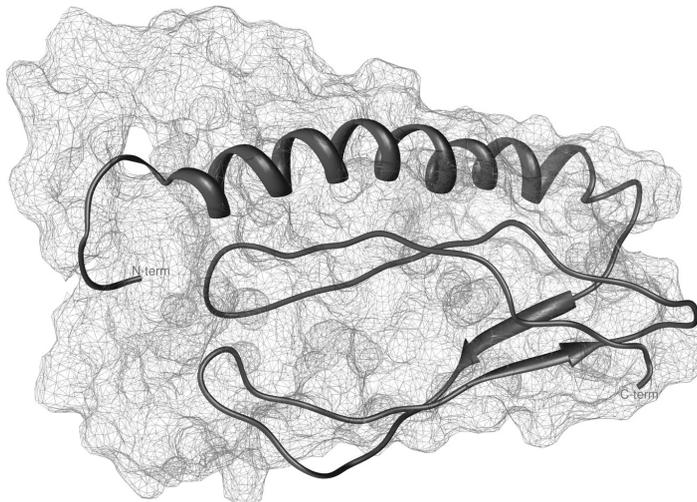


Figure 1.1. Modélisation de la structure moyenne supposée des protéines LEA de la classe 7 sur la base de la structure tridimensionnelle de la protéine LEA code PDB 1YYC.

Source : E. Jaspard – structure générée avec les programmes Modeller et Chimera.

- Le processus impliquant les protéines dites intrinsèquement non structurées ou nativement non structurées. Ces protéines n'ont pas de structure tridimensionnelle à l'état libre (ce qui explique qu'on ait mis tant de temps à les mettre en évidence). Elles n'acquièrent leur structure repliée, donc fonctionnelle, que quand elles interagissent avec leur(s) partenaire(s) cellulaire(s).

Des approches plus récentes et de très grande ampleur sont venues compléter les connaissances acquises pendant plus d'un siècle.

On peut notamment mentionner :

- La recherche à grande échelle de séquences de protéines mutées par diverses techniques. Exemple : MORPHING (*Mutagenic Organized Recombination Process by Homologous IN vivo Grouping*), méthode de mutagenèse aléatoire de courtes régions de protéines qui utilise l'appareil de recombinaison *in vivo* de la levure.
- Des approches biochimiques et physiques conjointes qui ont permis le développement de modèles du repliement de la chaîne polypeptidique. Par exemple :
 - le modèle du globe fondu (*molten globule*, Ohgushi & Wada, 1983).
 - le modèle de diffusion-collision (Karplus & Weaver, 1994) : la nucléation intervient en plusieurs points de la chaîne polypeptidique. Ces noyaux de nucléation diffusent et coalescent. On aboutit à des microstructures natives. Le repliement serait une succession d'étapes de diffusion-collision.
- En parallèle, les moyens informatiques de plus en plus puissants ont permis de développer des programmes de modélisation utilisant la mécanique ou la dynamique moléculaires (GROMACS, méthode de Monte-Carlo, méthode *ab-initio*, approche « Rosetta », ...).
 - Cela a permis l'émergence de nouvelles méthodes de conception et synthèse *de novo* de protéines. Par exemple, la protéine artificielle TOP7 en 2003.
 - En 2013, Martin Karplus, Michael Levitt et Arieh Warshel ont reçu le Prix Nobel de Chimie pour le développement de modèles multi-échelles pour des systèmes chimiques complexes.
- Des disciplines naissantes viennent compléter les connaissances acquises en enzymologie : la génomique structurale, la génomique fonctionnelle, la métagénomique, l'épigénomique, l'interactomique, la fluxomique, ... et bien d'autres domaines dits en « omique ».
 - La transcriptomique (qui s'appuie sur des techniques comme RNAseq) a pour but le séquençage en masse de toutes les molécules d'ARN. De plus, on arrive à analyser le contenu de chaque cellule (*single cell analysis*).
 - La protéomique qui s'appuie sur la spectrométrie de masse a pour but le séquençage de toutes les protéines et enzymes.