

I.1. Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions où, normalement, elles ne pourraient se faire. Si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes qui constituent la classe de protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Toutes les enzymes sont des protéines bien qu'on ait découvert quelques ARN à activité catalytique.

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes. Ils représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène puisqu'ils catalysent les milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules.

La biochimie n'est pas la seule discipline à bénéficier des connaissances acquises par l'enzymologie. En effet, la physiologie, la pharmacologie de même que la microbiologie ont largement recours aux « bienfaits » de l'enzymologie tant sur le plan technique que conceptuel. L'utilisation des enzymes sous leurs principales formes (préparation enzymatique ou purifiée) connaît son essor essentiellement au XXe siècle. Le développement et la maîtrise des procédés d'extraction des enzymes des cellules (microbienne, végétales et animale) ont permis les diverses utilisations largement connues aujourd'hui.

I.2. Historique

Il est difficile de 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.

1783 : Lazzaro Spallanzani a rapporté que la viande est liquéfiée par un extrait gastrique. Il note également que la température a un grand effet.

1814 : Kirchhoff a observé qu'un composant "glutineux" (comme il l'a appelé à l'époque) de blé convertit l'amidon en sucre.

1833 : La première découverte d'une enzyme est d'habitude attribuée à Anselme Payen et Jean-François Persoz qui ont traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol puis précipité une substance labile à la chaleur qui hydrolysait l'amidon. Ils ont appelé cette fraction "diastase" qui signifie "séparation" en Grec, puisque cette fraction séparait le sucre soluble de l'amidon insoluble. On sait maintenant que cette préparation était une solution non purifiée d'amylase.

1834 : Theodor Schwann a obtenu le premier agent actif d'origine animale (la pepsine) qu'il a partiellement purifiée en traitant la paroi stomacale par l'acide.

Il est important de souligner qu'à l'époque les premières observations d'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. A l'époque, la levure n'était pas encore considérée comme une cellule vivante.

1838 : Charles Cagniard de Latour montra que le processus de fermentation est dû à des organismes vivants.

1858 à 1871 : Les travaux de Louis Pasteur confirmèrent cette idée. Pasteur émit l'hypothèse révolutionnaire que les changements chimiques lors de la fermentation résultaient des processus de la vie des micro-organismes impliqués dans la fermentation.

A l'opposé, Liebig et Stahl privilégiaient 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 CO_2 et éthanol dont les liaisons étaient plus fortes.

1860 : Berthelot fit macérer de la levure et obtint une fraction précipitable à l'alcool capable de convertir le sucrose en glucose plus fructose. Il conclut que l'"invertase" (nom

qu'il donna à l'agent actif de cet extrait) était l'un des multiples ferments présents dans la levure.

1878 : Kühne proposa le nom d'enzyme (signifiant : "dans la levure") pour qualifier ces ferments. Le suffixe "ase" fût proposé par Duclaux en 1898.

1897 : Hans et Edouard Buchner s'intéressaient aux extraits de levure dans un but thérapeutique. Ces extraits étant destinés à l'homme ne pouvaient contenir des bactéricides. L'un de leur collaborateur suggéra de les remplacer par de grandes quantités de sucrose dont on savait qu'elle inhibait la croissance bactérienne.

Ainsi, la controverse Pasteur - Liebig prit fin quand les frères Buchner purent obtenir un extrait cellulaire total de levure qui pouvait faire la fermentation complète du sucre.

1897 : La même année, Bertrand observa que certaines enzymes requièrent des facteurs dialysables pour leur activité : il les nomma "coenzymes".

Au début du 20^e siècle, de gros travaux furent entrepris pour purifier des enzymes et surtout décrire leur activité catalytique en termes mathématiques.

1902 : V. Henri et Adrian Brown suggérèrent 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 obtenue quand on reporte la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en substrat (A. 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" proposé par Emil Fisher en 1894.

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

1913 : Leonor Michaelis et Maud Menten redécouvrirent l'équation de V. Henri et établirent la relation que l'on connaît actuellement sous le nom d'équation de Michaelis - Menten et qui en toute rigueur s'appelle l'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 ($E + S \rightleftharpoons ES$).

1925 : George Briggs et James Haldane généralisèrent l'équation précédente en introduisant le concept d'état stationnaire pour la concentration du complexe enzyme - substrat. Le fait que les enzymes sont des protéines ne fût accepté qu'à partir de la fin des années 20.

1926 : Sumner cristallisât l'uréase mais beaucoup affirmèrent qu'elle n'était qu'une impureté adsorbée dans le cristal protéique.

Années 30 : Northrop et ses collaborateurs cristallisèrent la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine et démontrèrent la pureté des cristaux obtenus.

Années 40 et 50 : Des centaines d'enzymes furent purifiées et cristallisées permettant ainsi l'élucidation de dizaines de voies métaboliques.

De nouvelles techniques chimiques et physiques furent employées pour analyser la structure des protéines.

1955 : Frédéric Sanger publia la séquence complète en acides aminés d'une petite protéine : l'insuline (masse molaire 6000 Da).

1957 : La première structure cristallographique d'une protéine (la myoglobine), déduite de la diffraction des rayons X, fût obtenue par Kendrew.

Années 60 : La première séquence d'une enzyme (la ribonucléase, masse molaire 13700 Da) fût publiée en 1960 et la première synthèse chimique (également de la ribonucléase) fût obtenue en 1969.

Les biochimistes focalisèrent alors sur le mécanisme de l'activité enzymatique et son mode de régulation.

1963 : Cleland proposa une procédure claire et uniforme pour écrire les équations des cinétiques des systèmes enzymatiques à plusieurs substrats.

1965 : Jacques Monod, Jeffries Wyman et Jean-Pierre Changeux proposèrent un modèle cinétique (modèle MWC) pour les enzymes allostériques (enzymes dont la courbe de vitesse en fonction de la concentration en substrat est de forme sigmoïdale et non hyperbolique).

1966 : Daniel Koshland, Nemethy et Filmer généralisèrent le modèle précédent en incluant la notion d'ajustement induit proposé par Koshland en 1959 (modèle KNF).

En 1969, il y avait la synthèse chimique de la ribonucléase qui possédait une activité catalytique et qui démontrait que les enzymes ne sont pas différents des autres catalyseurs non biologiques.

Pendant les années 80, l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant ont apporté des nouvelles compréhensions dues au fait que, pour la première fois, il était possible de modifier l'activité catalytique et la spécificité d'un enzyme de façon rationnelle et ceci par l'incorporation des mutations à des positions définies en utilisant la mutagenèse dirigée.

Plus récemment, il a été démontré que l'activité catalytique existait de façon limitée dans d'autres molécules biologiques.

- **Abzymes** : anticorps produits contre des analogues stables de l'état de transition et qui possèdent de l'activité catalytique dans certaines réactions hydrolytiques 10^3 plus vite par rapport de la réaction organique catalysée.
- **Ribozymes** : fragments de RNA qui possèdent les capacités à hydrolyser d'autres séquences de RNA et maintenant aussi des protéines 10^{-2} à 10^{-4} plus vite qu'une protéine.

I.3. L'enzymologie

L'enzymologie est la science qui vise à élucider la structure et le mode d'action des enzymes. Deux grands axes d'étude de l'enzymologie peuvent être distingués. Il s'agit de l'approche cinétique et de l'approche mécanistique. Il va sans dire que ces deux approches sont complémentaires. Les deux axes ci hauts décrits visent l'étude de processus enzymatique lui-même ; toutefois l'étude de la structure des enzymes constitue aussi un aspect important de l'enzymologie. Ultimement, l'étude approfondie d'un enzyme devrait conduire à une compréhension intime des relations structure-activité de cet enzyme.

I.4. Le génie enzymatique

Le « génie enzymatique » est une branche de l'ingénierie des bioprocédés qui relève de l'exploitation des enzymes en passant par l'identification de leurs spécificités, les conditions de leur purification, leur modification dans le but d'améliorer leurs propriétés et les conditions optimales de la catalyse enzymatique et enfin la production à grande échelle à des fins appliquées.

I.5. Les enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs qui augmentent la vitesse de réactions thermodynamiquement possibles et qui possèdent des propriétés catalytiques remarquables. Nettement plus efficaces que les catalyseurs chimiques, elles sont capables de multiplier la vitesse d'une réaction exergonique par des facteurs très élevés ($\times 10^6$ à 10^{12}) et ce dans des conditions de réactions plus douces, compatibles avec les phénomènes biologiques. Intactes à la fin de la réaction, elles ne déplacent pas le point d'équilibre d'une réaction équilibrée.

Certaines enzymes sont des holoprotéines monomériques (ex : la ribonucléase à 124 résidus d'AA $M = 13700$ Da) ou oligomériques (ex : la lactate déshydrogénase à 4 protomères $M = 150\ 000$ Da). D'autre sont des hétéroprotéines, la partie protéique (apoenzyme) n'est pas suffisante pour assurer seule la catalyse, elles nécessitent la présence d'un cofacteur (comme un ion métallique) ou d'un coenzyme (petite molécule non protéique \pm fixée à l'apoenzyme).

I.6. Isoenzymes

Enzymes catalysant la même réaction sur le même substrat, mais ayant des structures protéiques différentes. La LDH tétramérique possède 2 types de protomères (H et M : H₅, H₄M, H₃M₂, M₄), il en résulte 5 isoenzymes séparables par électrophorèse. La répartition varie selon les organes (H domine dans le cœur, M dans le muscle).

I.7. Pouvoir catalyse des enzymes

Un enzyme peut accélérer une réaction chimique par un facteur dépassant 10¹⁴.

- Hexokinase > 10¹⁰,
- Phosphorylase > 3 × 10¹¹,
- Alcool déshydrogénase > 2 × 10⁸,
- Créatine kinase > 10⁴

Quant à des comparaisons entre des catalyseurs enzymatiques et des réactions catalysées non-enzymatiques, les enzymes ont démontré un pouvoir catalyseur très élevé et ceci à des températures relativement basses.

Substrat	Catalyseur	Température °K	Constante de vitesse M ⁻¹ s ⁻¹
<u>Amide (hydrolyse)</u>			
Benzamide	H ⁺	325	2.4 × 10 ⁻⁶
Benzamide	OH ⁻	326	8.5 × 10 ⁻⁶
Benzoyl-L-tyrosinamide	α-chymotrypsine	298	14.9
Urée (hydrolyse)	H ⁺	335	7.4 × 10 ⁻⁷
	uréase	294	5.0 × 10 ⁶
2H ₂ O ₂ → 2H ₂ O + O ₂	Fe ²⁺	295	56
	catalase	295	3.5 × 10 ⁷