



Eduard Buchner, ou un siècle d'enzymologie

Broyer un kilo de levure, en extraire 300 ml de jus à la presse hydraulique, filtrer et observer un dégagement rapide d'acide carbonique consécutif à l'addition de sucre de canne... telle est, dans sa simplicité, l'expérience décrite par Eduard Buchner en janvier 1897 [1]. Comme il était de rigueur à cette heureuse époque, les résultats sont présentés sous un titre neutre et modeste (« La fermentation alcoolique des levures: une communication préliminaire ») (figure 1), mais son auteur devait avoir conscience d'une découverte importante, et ses contemporains ne s'y tromperont pas, ni la postérité qui y reconnaît une des grandes sources de la biologie moléculaire [2-4].

Eduard Buchner (1860-1917)* est le type même de ces chimistes allemands qui ont tant marqué le développement scientifique et industriel de leur époque. Né d'une famille bourgeoise et universitaire, il entame naturellement, si l'on ose dire, une carrière académique qui sera fortement encouragée par son frère aîné Hans, professeur à l'université de Munich et physiologiste réputé dont il sera question plus loin. Il prépare un doctorat

* (1860-1917). De nombreux auteurs infligent à Buchner un tréma d'autant plus fâcheux qu'il conduit parfois à une confusion absurde avec son quasi-contemporain Ludwig Büchner, médecin et philosophe matérialiste, ardent opposant du vitalisme en biologie, dont le point de vue a effectivement été conforté par le travail scientifique d'Eduard Buchner... mais c'est probablement le seul lien entre les deux hommes.

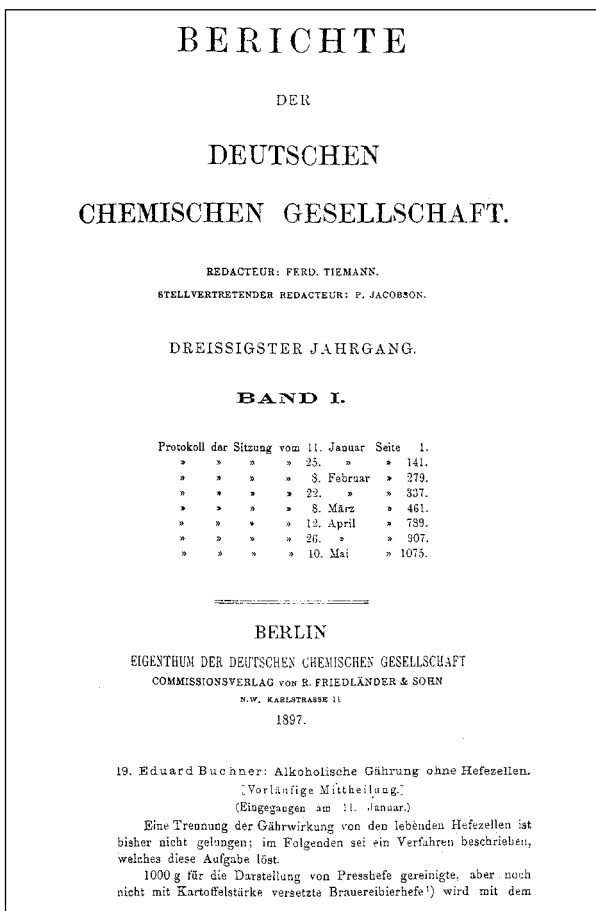


Figure 1. Page de titre des Comptes rendus de la Société allemande de Chimie, dans lesquels l'article de Buchner parut le 11 janvier 1897. On notera la sobriété du paragraphe introductif, qui tient en trois lignes : « Il n'avait pas été possible jusqu'ici d'obtenir une activité de fermentation en dehors des cellules vivantes de levure. Cet objectif est atteint par le procédé expérimental décrit ci-dessous. »

en chimie à Munich, chez Karl von Baeyer, grand spécialiste des synthèses organiques qui sera prix Nobel deux ans avant lui (1905). Sa thèse porte sur la synthèse organique des colorants (qui est alors un des secteurs les plus actifs de l'industrie chimique) et il continuera de travailler dans ce domaine par la suite, menant une double carrière d'organicien et de physiologiste. Après une première publication où il montre que la fermentation microbienne peut, contrairement à la thèse de Pasteur, se dérouler en présence d'oxygène, sa démonstration de la catalyse intracellulaire de la fermentation levurienne le fait reconnaître comme un des chefs de file de la biochimie en Allemagne, lui valant un des premiers prix Nobel de Chimie. Sa fin est celle, inepte et tragique, de tant de ses contemporains : engagé volontaire en 1914, il est tué en Roumanie en 1917. Pas de grand mystère, donc, pas de controverse flamboyante dans l'œuvre de Buchner. C'est par une observation de naturaliste, par une démarche expérimentale très simple qu'il résout la controverse scientifique qui oppose, tout au long du XIX^e siècle, les conceptions « vitalistes » et « matérialistes » des processus physiologiques. Avec lui, la perception du fonctionnement cellulaire n'est plus la même, le regard porté sur la chimie du vivant s'altère au point que le mode de raisonnement et même le mode d'expérimentation antérieurs nous deviennent étrangers. Car, nous le savons depuis Foucault [5], c'est notre propre code d'interprétation des faits qui rend opaque la pensée de nos devanciers, empêchant la reconstitution intellectuelle de ce qui se passait dans la tête de nos devanciers, non pour en faire la critique avec l'autorité arrogante de notre propre savoir mais pour mieux voir les enjeux des controverses scientifiques d'aujourd'hui, et situer la fragilité de notre propre approche.

Respiration et fermentation alcoolique

D'une certaine manière, l'histoire commence à la fin du XVIII^e siècle lorsque Lavoisier [6] élabore son in-

terprétation chimique quantitative des phénomènes physiologiques, qu'il applique à la respiration (interprétée comme une combustion), et à la fermentation alcoolique qu'il avait, de notre point de vue, « correctement » interprétée comme un processus d'oxydo-réduction (« *Les effets de la fermentation vineuse se réduisent donc à séparer en deux portions le sucre, qui est un oxyde, à oxygéner l'une aux dépens de l'autre pour en former l'acide carbonique, à désoxygéner l'autre en faveur de la première pour en former une substance combustible qui est l'alcool. De sorte que, s'il était possible de recombinaison ces deux substances, l'alcool et l'acide carbonique, on reformerait du sucre* »), selon l'équation sucre = éthanol + gaz carbonique qui allait être établie quantitativement par Gay-Lussac (1815). Lavoisier et Gay-Lussac savent naturellement, comme toute ménagère, que la fermentation dépend de cet agent mystérieux qu'est la levure, mais ils ne semblent pas s'être posé la question de la nature microbienne de celle-ci, et l'eussent-ils fait que les microscopes alors disponibles ne les y auraient guère aidés. Le développement technique des microscopes dans la première moitié du XIX^e siècle (et principalement l'usage des lentilles achromatiques) allait changer radicalement les choses. Dès 1837, Cagniard-Latour et Theodor Schwann (le père de la théorie cellulaire) observent indépendamment que la fermentation est invariablement associée à la présence de « globules » microbiens dans le jus de fermentation. Comprendre et maîtriser la fermentation alcoolique était un objectif industriel capital au début du XIX^e siècle, à une époque où la production vinicole et brassicole s'industrialise, où les solvants organiques (et le plus commun d'entre eux, l'éthanol) jouent un rôle clé dans l'industrie chimique naissante, en particulier celle des colorants. Le mémoire de Cagniard-Latour visait d'ailleurs à résoudre une question proposée officiellement par l'Institut en l'an VIII (la réponse à cette question devait initialement être récompensée par un Prix d'un kilo d'or...) sur « les caractères de la matière animale et végétales qui distinguent ceux qui sont utilisés comme ferment ».

Avec cette découverte, brasseurs et viticulteurs ont désormais un cadre de connaissance qui va leur permettre d'organiser leur production selon un mode réellement industriel, et on sait l'importance que ces préoccupations auront dans l'œuvre d'un Pasteur. Cependant, une description purement microbienne de la fermentation ne pouvait réellement satisfaire les chimistes, et renvoyait plus généralement à la controverse entre les interprétations « mécanistes » (ou matérialistes) et « vitalistes » du fonctionnement des êtres vivants, telle qu'elle domine toute la biologie du XIX^e siècle. Ce débat, si crucial dans la naissance de la biologie moderne, a été bien analysé par François Jacob dans sa « Logique du Vivant » [4]. On se contentera donc de rappeler ici les points de vue emblématiques de Liebig et Pasteur, même si, bien entendu, l'histoire ne s'arrête pas aux positions très médiatisées, dirait-on aujourd'hui, de ces deux hommes.

Par rapport à l'énoncé lumineux de Lavoisier [6] (« *La machine animale est principalement gouvernée par trois régulateurs principaux : la respiration qui consomme de l'oxygène et du carbone et qui fournit du calorique ; la transpiration qui augmente ou diminue selon qu'il est nécessaire d'emporter plus ou moins de calorique ; enfin la digestion qui rend au sang ce qu'il perd par la respiration et la transpiration* »), nous avons quelque mal à saisir l'attitude d'un Liebig [7] pour qui, même après la première synthèse organique de l'urée par Wöhler, « *les réactions des corps simples et des combinaisons minérales préparées dans nos laboratoires ne peuvent trouver aucune espèce d'application dans l'étude de l'organisme vivant* ». Cette position avait cependant pour elle la force de l'évidence : la « machine animale » ne fonctionne-t-elle pas dans des conditions douces de pression et de température sans rapport avec la combustion chimique, sans rapport non plus avec les conditions opératoires des synthèses organiques ? Pour Liebig, donc, « *les phénomènes de décomposition ne sauraient s'expliquer que par l'effet du contact d'un corps qui se trouve lui-même en état de décomposition ou de combustion... le mouvement des molécules de l'un des corps en réaction doit influencer*

l'équilibre des molécules du corps en contact avec lui». Amphigouri, pensée molle? Peut-être, mais aussi évaluation réaliste de la complexité des réactions physiologiques, de leurs paramètres cinétiques et thermodynamiques, et de l'impossibilité de les expliquer de façon productive dans le cadre théorique de la chimie de l'époque.

Le rôle du vivant

Comment s'en sortir? Avec la clairvoyance que donne l'histoire, nous savons aujourd'hui qu'un élément important du débat réside dans le principe de la catalyse chimique, découvert peu avant par Berzelius. Ce dernier avait d'ailleurs clairement entrevu le rôle biologique de la catalyse lorsqu'il écrivait « *il est probable qu'il se produit chez la plante ou l'animal vivant des milliers de processus catalytiques différents grâce auxquels les matériaux bruts uniformes du suc végétal ou du sang donnent lieu à une quantité de combinaisons chimiques différentes* » [8]. Cependant, la chimie du milieu du XIX^e siècle n'avait pas de cadre explicatif cohérent qui pût conduire à une explication moléculaire du vivant, au sens qui est le nôtre. Le fonctionnement chimique interne de la cellule est donc le plus souvent traité comme une boîte noire, plus propre aux spéculations idéologiquement voire politiquement connotées entre vitalistes et matérialistes qu'au discours factuel. Nombreux sont les chimistes et physiologistes de l'époque qui attribuent le fonctionnement de la cellule à une « force vitale » dont on estime qu'elle est, au moins provisoirement, hors d'atteinte expérimentale.

La position de Pasteur est plus lisible à nos yeux (Pasteur est, du moins en France, le héros positif d'une histoire imaginaire de la science où le pauvre Liebig n'a pas le meilleur rôle). On sait avec quelle force il associe la capacité des levures et des autres micro-organismes à fermenter avec leur caractère « vivant », afin de contrer l'interprétation de la fermentation associée à la décomposition de la matière organique défendue par Liebig, pour qui la fermentation levurienne n'est qu'une conséquence de la décomposition des levures. Sa conclu-

sion, comme il est habituel chez lui, est formulée avec une grande netteté et un soupçon d'arrogance : « quiconque jugera avec impartialité les résultats de ce travail... reconnaîtra avec moi que la fermentation s'y montre corrélative de la vie, de l'organisation de ces globules (*les levures*), non de leur mort ou de leur putréfaction (*et pan sur Liebig...*), pas plus qu'elle n'y apparaît comme un phénomène de contact, où la transformation du sucre s'accomplirait en présence du ferment sans rien lui donner, sans rien lui prendre (*et toc pour Berzelius*) » [9]. Il défendra encore fortement ce point de vue en 1878, en réfutation d'un écrit posthume de Claude Bernard. Pourquoi Pasteur, qui étudie avec une telle précision les conséquences chimiques de la fermentation (révisant, entre autres, de façon remarquable l'analyse quantitative de la fermentation par Gay-Lussac, et montrant la production d'acide succinique lors de celle-ci), et dont l'œuvre entière est une réflexion sur la chimie des phénomènes biologiques et sur l'origine de la vie, ne se pose-t-il pas, au moins en théorie, la question de ce qui se passe à l'intérieur du « globule » (c'est-à-dire de la cellule, terme que Pasteur n'emploie jamais pour parler de micro-organismes, car la théorie cellulaire n'est pas, à cette époque, étendue à ceux-ci)? Méfiance, voire prudence politique par rapport aux débats idéologiquement explosifs entre « vitalistes » et « matérialistes »? Peut-être, mais sans doute aussi reflet de cette idée-force, de ce véritable « dada » que fut chez Pasteur l'insistance à corréliser la vie et la dissymétrie moléculaire. Thème récurrent où l'on peut voir une intuition fondamentale, légitimée *a posteriori* par la structure des acides aminés, voire par l'organisation de la double-hélice, mais qui a aussi conduit le jeune Pasteur à des expérimentations un peu étranges*. Plus profondément, la volonté de Pasteur de s'en tenir au micro-organisme vivant est inhérente à la logique même de sa démonstration scientifique, et aux exigences tactiques voire rhétoriques de son approche expérimentale. Ouvrir la cellule, c'est la tuer, c'est donc se placer

dans l'hypothèse de Liebig qui voit dans la fermentation la conséquence de la décomposition des levures. Or, l'objectif expérimental est justement de « falsifier »** cette hypothèse en démontrant que tuer le ferment (par des moyens allant de l'ébullition au traitement par le jus d'oignon...) c'est empêcher la fermentation [9].

La catalyse... naissance de l'enzymologie

Les physiologistes du milieu du XIX^e siècle (comme Hoppe-Seyler ou Claude Bernard, pour ne citer que les plus grands) avaient rapproché explicitement la fermentation microbienne et la respiration ou la digestion animale. Theodor Schwann (encore lui) avait montré dès 1836 que l'activité digestive du suc gastrique n'était pas seulement due à son acidité mais à l'existence de la pepsine, dont il avait souligné la ressemblance avec les catalyseurs de Berzelius en notant qu'elle agissait en quantité infime, non stœchiométrique. D'autres « diastases », « ferments solubles » ou « ferments organisés » com-

* « *J'étais tout entier à la pensée d'introduire la dissymétrie dans les phénomènes chimiques. A Strasbourg, déjà, j'avais fait construire par Ruhmkoff de puissants aimants ; à Lille, j'avais eu recours à des mouvements tournants, provoqués par des mécanismes d'horlogerie. J'allais essayer de faire vivre une plante, dès sa germination, sous l'influence des rayons solaires renversés à l'aide d'un miroir conduit par un héliostat... Ces tentatives, dont quelques-unes me semblent aujourd'hui grossières... n'ont pas été stériles* » (1883, Conférence à la Société Chimique de Paris). Pasteur n'a jamais abandonné cette ligne de recherche : Dans une lettre à son ami Raulin (4 avril 1871) il écrit : « je crois à une influence cosmique dissymétrique qui préside naturellement à l'organisation moléculaire des principes essentiels à la vie... je voudrais arriver par l'expérience à saisir quelques indices sur la nature de cette grande influence cosmique dyssymétrique... j'essaie en ce moment de faire cristalliser le racémate... sous l'influence d'une spirale solénoïde en activité... je ne désespère pas d'arriver par là à une modification très profonde, très imprévue, extraordinaire, des espèces animales et végétales ».

** Le terme « falsifier » est bien entendu employé ici au sens qu'il a acquis en épistémologie : il ne s'agit pas d'accuser Pasteur d'une quelconque mauvaise foi (même si ce polémiste-né n'en était pas exempt), mais d'insister avec Popper sur le fait qu'une théorie scientifique progresse par l'invalidation d'un énoncé théorique précédent. Inversement, l'expérience de Buchner « falsifie » à son tour l'énoncé pastorien, puisque c'est le broyat cellulaire lui-même qui devient l'agent de la fermentation.

me on les appelait alors avaient été observés, dans les sucs digestifs comme la trypsine, mais aussi associés à la levure comme l'invertase: tous, cependant, étaient extracellulaires et l'idée dominante était que ces catalyseurs biologiques fussent nécessairement des facteurs sécrétés par la cellule. L'intérieur de la cellule révélait pourtant (dans les cellules animales ou végétales suffisamment grandes pour être examinées) une organisation et une structure auxquelles on donnait le nom de «protoplasme». Ce terme (équivalent du cytoplasme actuel) était d'autant plus populaire qu'il était commodément vague, et généralement pris dans un sens vitaliste comme étant l'agent irréductible de l'ensemble des processus physiologiques.

On a néanmoins quelque peine à comprendre qu'il ait fallu les dernières années du siècle pour que quelqu'un s'essaye sérieusement à broyer des cellules et à examiner l'extrait acellulaire pour sa capacité de catalyser la fermentation. Paradoxalement, même l'expérience de Buchner n'a pas été directement faite dans ce but. En fait, l'initiative de cette étude revient à son frère aîné Hans qui, étudiant la réponse inflammatoire lors de l'infection bactérienne, avait fait l'hypothèse que celle-ci était déclenchée par le contenu intracellulaire des bactéries. Eduard Buchner (qui, à la suite de son doctorat, était devenu *Privatdozent* auprès de Karl von Baeyer à Munich) avait travaillé sur le projet de son frère en tentant de préparer des broyats bactériens ou de levures. Broyer des cellules microbiennes de façon quantitative et dans des conditions que l'on pouvait supposer non destructives de leur activité physiologique n'était cependant pas une sinécure, et aucun résultat concluant n'avait été obtenu lorsqu'Eduard Buchner quitta Munich pour l'université de Kiel, où il avait été nommé en 1893. Il semble que l'assistant de Hans, Martin Hahn, ait fini par résoudre le problème (par l'addition de *kieselguhr* et par l'emploi d'une presse hydraulique) au cours de l'été 1896. Eduard Buchner (alors en vacances à Munich), ayant suggéré de conserver les extraits en y ajoutant une forte concentration

de sucre, il en résulta un dégagement de gaz carbonique... immédiatement reconnu par Buchner comme l'indice d'une fermentation alcoolique.

Si l'on en croit cette version des choses (qui est celle de Buchner lui-même), la découverte de l'activité enzymatique des extraits acellulaires serait donc fortuite. Mais le mythe de l'observation fortuite est très fort en science naturelle, et il n'est pas impossible que Buchner, que son travail antérieur avait nécessairement familiarisé avec la controverse sur la nature «chimique» ou «biologique» de la fermentation, ait eu sa petite idée derrière la tête. Quoi qu'il en soit, il a su exploiter tambour battant l'observation initiale: dans les semaines qui suivent, il montre que la fermentation par l'extrait acellulaire opère en présence de glucose, maltose et fructose, mais pas avec du lactose ou du mannitol, de même que ces produits ne sont pas fermentés par la levure intacte. L'activité est inactivée par chauffage à 50 °C, et il tente même, semble-t-il, sa purification par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. La communication aux *Berichte der Chemischen Gesellschaft* (que ne co-signent ni Martin Hahn, ni Hans Buchner) est très claire dans ses conclusions: «le processus de fermentation n'exige donc pas l'appareil compliqué que représente la cellule de levure. Il est vraisemblable que l'agent du jus actif dans la fermentation est une substance soluble, sans doute de nature albuminaire. Nous l'appellerons «zymase».

Conclusion

Malgré quelques résistances initiales, l'importance du travail a été très rapidement admise. Dès la même année, Duclaux (deuxième directeur de l'Institut Pasteur) en souligne la valeur en des termes particulièrement élogieux qui indiquent, en tous cas, qu'il ne partageait pas le nationalisme un peu crispé de son prédécesseur. En quelques années, une révolution silencieuse se fait dans la tête des biologistes cellulaires, et le «protoplasme» comme principe actif des réactions physiologiques disparaît très rapidement de la littérature scientifique (le protoplasme fait depuis peu

un curieux retour dans la littérature scientifique sous le nom de «protéome», ou réseau interactif de l'ensemble des protéines opérant dans une cellule donnée, mais ceci est une autre histoire...). En 1901, Hofmeister propose l'idée que chaque réaction métabolique est due à une enzyme distincte, ouvrant la voie à Warburg, Meyerhof, Krebs et tant d'autres qui reconstituent le métabolisme de la fermentation alcoolique et de la respiration. En 1909, Garrod, se fondant sur l'étude de l'alcaptonurie, propose que les maladies héréditaires soient dues à la déficience congénitale d'une enzyme spécifique: une biologie nouvelle est née... ■

RÉFÉRENCES

1. Buchner E. Alkoholische Gährung ohne Hefezellen: vorläufige Mitteilung. *Berichte der Chemischen Gesellschaft* 1987; 30: 117-24.
2. Kohler RE. The reception of Eduard Buchner's discovery of cell-free fermentation. *J Hist Biol* 1972; 5: 327-53.
3. Teich M. *A documentary history of biochemistry*. Leicester: Leicester University Press, 1992.
4. Jacob F. *La Logique du Vivant*. Paris: Gallimard, 1970.
5. Foucault M. *Les Mots et les Choses*. Paris: Gallimard, 1966.
6. de Lavoisier A. *Traité Élémentaire de Chimie*. Paris: 1789.
7. von Liebig J. *Chimie organique appliquée à la physiologie végétale*. Traduction française. Paris: 1842.
8. Jacob F. *La Logique du Vivant*. Paris: Gallimard, 1970: 112.
9. Pasteur L. *Mémoire sur la fermentation appelée lactique* (1857). In: *Louis Pasteur: écrits scientifiques et médicaux*. Paris: Garnier-Flammarion, 1994.

Pierre Thuriaux

*Docteur ès sciences, directeur de l'équipe de génétique des levures.
Service de biochimie et de génétique moléculaire, Bâtiment 142, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.*

TIRÉS À PART

P. Thuriaux.