

2- ENZYMOLOGIE

2.1- LES ENZYMES, PROTÉINES CATALYTIQUES

LES ISOENZYMES (paragraphe 1.6)

Dans les années 50-60, grâce au développement de nouvelles méthodes de séparation des préparations enzymatiques, plusieurs chercheurs ont mis en évidence des formes multiples d'enzymes. À partir d'une solution partiellement purifiée de LDH (lactate déshydrogénase), Kaplan a déterminé par électrophorèse que la solution contenait 5 formes qui avaient la même activité enzymatique. Est alors apparu le concept d'isoenzyme.

Les isoenzymes sont des formes multiples d'enzymes provenant d'une modification génétique de la structure primaire de la protéine et catalysant une même réaction pour un organisme donné. Les isoformes présentent habituellement des paramètres cinétiques différents ou des propriétés de régulation différentes.

1. Mise en évidence des isoenzymes de la LDH

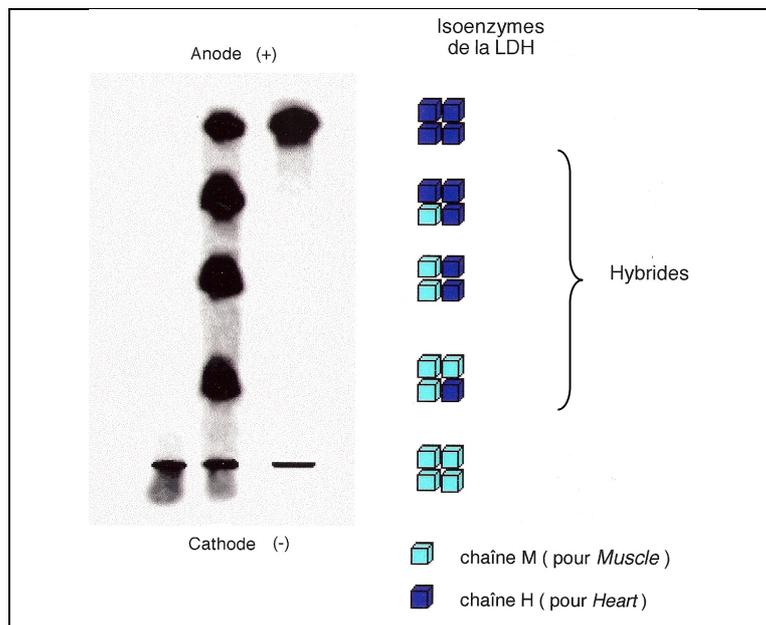


Figure 1 : électrophorèse de solutions de LDH extraite de différents tissus bovins (à gauche : muscle, au centre : sérum, à droite ; cœur) et mise en évidence des 5 formes isoenzymatiques.

Si on analyse une solution possédant une activité lactate déshydrogénase grâce à une électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes, on peut observer jusqu'à cinq bandes.

A gauche, l'extrait enzymatique provient d'un **muscle** : on obtient une bande qui migre légèrement vers la cathode.

A droite, l'extrait provient du **cœur** : on obtient une seule bande à forte mobilité électrophorétique.

Dans le **puits central**, on travaille sur un **extrait sérique** : on obtient cinq bandes.

Le milieu étant non dénaturant, cela signifie que la LDH est une enzyme tétramérique car on obtient 5 bandes. On obtient une seule bande dans les deux extraits de muscle et de cœur, on a donc deux types de sous-unités appelées H et M de poids moléculaires $35\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. On en déduit la structure quaternaire des isoenzymes de la LDH.

2. Structures des isoenzymes

2.1. Protéines possédant une structure primaire similaire mais non identique

Les isoenzymes sont des formes multiples d'enzymes provenant d'une modification génétique de la structure primaire de la protéine et non d'une modification ultérieure d'une même séquence.

LDH-M	ATLKDQLIHNLLKEE . HVPHNKITVVGUGAVGMACAISILMKELADEIALVDVDMEDKLGEMMDLQHGSFLRTPKIT
LDH-H	ATLKEKLIAPVAQQE TTI PNNKITVVGUGQVGMACAISILGKSLTDE L ALVDVLE D KLGEMMDLQHGSFL Q TPKIT
	SGKDYNTAHSRLVITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNIVKYSNCKLLVSNPVDILTYVAVKISGFPKNRVIGSGCNLDSARF
	AN KDY S VTAHS K I V V V TAG V RQQEGESRLNLVQRNVN V FKFIIP Q IVKYSNCK IT IVVSNPVDILTYV T W K L S GLPK H RVIGSGCNLDSARF
	RYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSVAVWSGVNVAGVSLKNLHPELGTADADKEHWKAVHKEVVD SAYEVIKLGKGYT N WAIGLS
	RYLMA E KLG V HP S SCHGWILGEHGDSVAVWSGVNVAGVSL Q OLNP E MGTD N SEN W KE V H K M V VE S AYEVIKLGKGYT N WAIGLS
	VADLAESIMKNLRRVHP I STMIKGLYGIKENVFLSVPCILGQNGISDVVKVTLTP E EEAHLKKSADTLWGIQKELQF (331 aa)
	VADL I ES M L K NL S R I HP V STM V Q G MYGI E NEVFLS L PC V L N ARGLTS V IN Q KL K DD E V A QL K NSADTLWGIQK D L K D L (333 aa)

Figure 2 : séquence en acides aminés des chaînes M et H de la LDH de porc

2.2. Protéines codées par des gènes

2.2.1. Gènes différents liés ou non

Les isoenzymes sont codées par des gènes du noyau. Les gènes qui codent ces protéines ou les sous-unités de celles-ci peuvent être sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents.

2.2.2. Allèles différents : allozymes

Les allozymes sont les produits d'un même gène qui possèdent des allèles différents. Les deux allèles d'un gène codant une isoenzyme sont codominants chez un individu hétérozygote.

3. Propriétés et fonctions des isoenzymes

3.1. Répartitions tissulaire et cellulaire

Les enzymes ont généralement une grande spécificité de fonction. Chaque tissu est équipé d'enzymes en relation avec sa fonction. Mais cette organospécificité n'est pas absolue. En effet, la LDH se trouve en quantité comparable dans différents tissus (cœur, foie, muscle squelettique). Ce manque de spécificité absolue est compensé par la présence des isoenzymes. Dans le cœur, on trouve plutôt la LDH₁(H₄) et la créatine kinase CK-MB (B pour *brain* : cerveau), alors que dans les muscles squelettiques, on trouve la LDH₅(M₄) et la CK-MM.

La distribution des enzymes varie suivant les tissus, mais aussi à l'échelle inférieure au niveau cellulaire.

La quantité d'isoenzymes contenues dans le sérum est faible.

3.2. Propriétés différentes

3.2.1. selon l'espèce

Quel que soit le tissu considéré, l'isoenzyme a une mobilité électrophorétique propre à chaque espèce. La LDH est une isoenzyme universelle. Son profil électrophorétique varie selon l'espèce.

3.2.2. selon le tissu ou le compartiment cellulaire

La LDH musculaire est majoritairement de type M₄ alors que la LDH du muscle cardiaque est majoritairement de type H₄.

3.2.3. selon le stade de l'ontogenèse¹

La synthèse des isoenzymes d'une même espèce varie au cours du développement embryonnaire. On peut observer une apparition et une augmentation de leur activité ou au contraire une disparition de cette activité.

¹ Ontogenèse : développement d'un individu depuis sa conception (fécondation) jusqu'à sa forme adulte définitive.

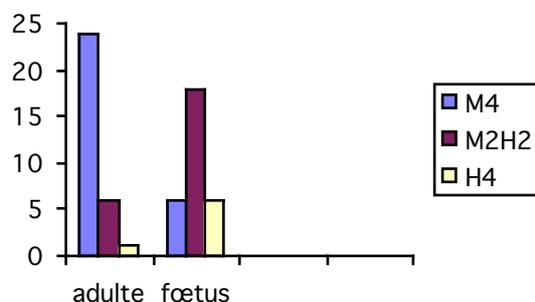


Figure 3 : exemple de la variation de la distribution des isoformes de la LDH entre l'adulte et le fœtus humain dans le foie.

Application médicale : certaines enzymes du catabolisme du glucose dans les cellules malignes (cancéreuses) sont des isoenzymes fœtales et non adultes. Si on arrivait à comprendre comment s'effectue le changement d'activité au cours de l'ontogenèse, on pourrait peut-être modifier les isoenzymes des cellules cancéreuses en isoenzymes saines.

3.3. Propriétés physico-chimiques

3.3.1. Mobilités électrophorétiques différentes

La structure primaire des isoenzymes diffère de quelques acides aminés. La modification d'un résidu et donc éventuellement de la charge ionique peut modifier la charge ionique de la molécule et donc sa mobilité électrophorétique.

3.3.2. Stabilité

Les isoenzymes d'une même famille ont une stabilité différente. Ainsi, grâce à des méthodes de dénaturation telle que l'inactivation par la chaleur ou par l'urée, on va pouvoir détecter les différences structurales d'un mélange isoenzymatique.

3.4. Propriétés catalytiques

3.4.1. Constantes cinétiques différentes

Les isoenzymes sont des protéines enzymatiques qui catalysent la même réaction mais leurs paramètres cinétiques vis-à-vis d'un même substrat sont souvent différents. D'où la possibilité de régulation fine selon les besoins de la cellule ou du tissu.

Exemple : isoformes de l'hexokinase (HK I à IV) (E.C. 2.7.1.1.)

- HK I à III : isoenzymes de forte affinité pour le glucose (à faible K_M autour de $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- HK4 = glucokinase hépatique avec un K_M de $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ vis-à-vis du glucose (100 fois plus élevé, moins d'affinité pour le glucose, active pour de fortes concentrations en glucose)

3.4.2. Régulations différentes de leur activité enzymatique

Du fait de leurs propriétés catalytiques, l'activité enzymatique des isoenzymes d'une même famille est régulée différemment. Des isoenzymes d'une même famille ne sont pas régulées et sensibles aux mêmes effecteurs.

3.5. Propriétés immuno-chimiques

Si on injecte un mélange d'isoenzymes chez une souris, on obtient un anti-sérum spécifique de toutes les formes enzymatiques (mélange polyclonal). Les sous-unités peuvent porter des déterminants antigéniques distincts. On peut observer des réactions croisées du fait d'isoformes ayant les mêmes sous-unités (ex : H_3M , H_2M_2 et HM_3).

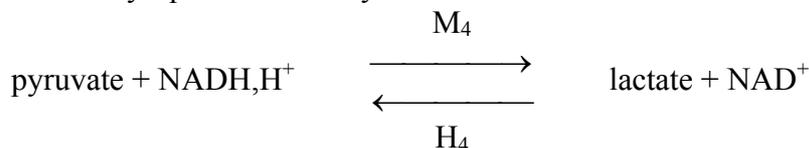
4. Répartition dans l'organisme et fonctions biologiques des isoenzymes

4.1. Fonctions biologiques principales

4.1.1. La compartimentation des voies métaboliques

a. entre les tissus

Les interconversions du pyruvate et du lactate sont facilitées grâce aux différentes propriétés catalytiques des isoenzymes de la LDH dans les différents tissus.



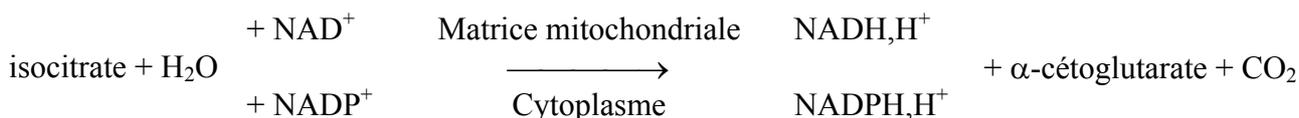
Au niveau cardiaque, le lactate est oxydé en pyruvate qui est alors dégradé en conditions aérobies grâce au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire (récupération maximale d'énergie).

Au contraire, au niveau musculaire, le pyruvate est réduit en lactate ; cela permet la régénération des coenzymes pour permettre la réalisation de la glycolyse en conditions anaérobies.

b. entre les compartiments sub-cellulaires

L'isocitrate déshydrogénase (IDH) existe sous deux formes isoenzymatiques :

- la forme mitochondriale fonctionne principalement avec le coenzyme NAD^+
- la forme cytoplasmique fonctionne avec le coenzyme NADP^+



L'IDH mitochondriale intervient dans le cycle de Krebs et crée du pouvoir réducteur sous forme de NADH, H^+ qui sera régénéré au niveau de la chaîne respiratoire.

L'IDH cytoplasmique produit du NADPH, H^+ qui va permettre la réalisation des réactions anaboliques réductrices (lipogénèse = synthèse des acides gras).

4.1.2. Rôle dans la régulation des voies métaboliques

a. Régulation de la glycémie

De nombreuses enzymes de la glycolyse possèdent des formes isoenzymatiques : l'hexokinase, la fructose-2-bisphosphatase, l'aldolase, la pyruvate-kinase,...

b. Régulation du niveau énergétique

La régulation de l'activité de l'IDH permet de réguler le rapport $\text{NADPH}, \text{H}^+ / \text{NADP}^+$ qui doit être très supérieur à 1.

La régulation de l'activité de la MDH au niveau de la navette mitochondriale permet de réguler le rapport $\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+$ qui doit aussi être très supérieur à 1.

Conclusion

Les isoenzymes ayant une répartition dans l'organisme bien définie, elles sont de bons marqueurs tissulaires.

Exemple 1 : lors de la nécrose tissulaire, il y a libération des isoenzymes intracellulaires. Cela a un intérêt pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde. Le praticien peut demander un dosage de la LDH et de la CK. L'évolution des activités enzymatiques est très caractéristique et permet de dater la survenue de l'ischémie cardiaque :

- l'élévation de la CK totale et de son isoenzyme CK-MB est précoce et peu durable,
- l'élévation de la $\text{LDH}_1(\text{H}_4)$ et de la $\text{LDH}_2(\text{H}_3\text{M})$ est tardive et plus durable.

Exemple 2 : la γ -glutamyltransférase (γ -GT) est un marqueur très sensible du dysfonctionnement hépatique. Cela permet la détection d'hépatites, le dépistage de l'éthylisme chronique et la surveillance de l'évolution de la maladie (ex : suivi du sevrage alcoolique avec diminution de l'activité enzymatique sérique de la γ -glutamyltransférase).

Exemple 3 : une autre application importante est le suivi des périodes de rémission et de reprise tumorale lors de traitement de cancers. Les enzymes principalement utilisées sont : la phosphatase alcaline (PAL) pour apprécier le traitement de tumeurs osseuses, la LDH dans le traitement de cancers testiculaires,...