

LA MULTIPLICITÉ ENZYMATIQUE : ASPECTS STRUCTURELS, GÉNÉTIQUES, PHYLLOGÉNIQUES, ONTOGÉNIQUES, MÉTABOLIQUES ET PATHOLOGIQUES (1)

F. E. SLUSE (2)

L'hétérogénéité moléculaire des enzymes fut tout d'abord considérée comme un artéfact. La notion d'isoenzymes, c'est-à-dire d'espèces moléculaires distinctes catalysant une même réaction, s'est finalement imposée il y a une vingtaine d'années. Les informations sur l'hétérogénéité enzymatique se sont accumulées depuis et on estime maintenant qu'au moins 50 % des enzymes n'existent pas en tant que protéines uniques mais bien en tant que séries d'isoenzymes. Bien que l'isoenzymologie ne soit pas une discipline distincte, elle donne néanmoins une nouvelle dimension à la plupart des domaines importants de la biologie tels que l'enzymologie, la biologie cellulaire, la biologie du développement, la génétique, l'évolution, la pathologie et la clinique.

Cette leçon sera une introduction aux différents aspects de l'isoenzymologie. Nous examinerons successivement : les causes de la multiplicité enzymatique, son importance en génétique, sa signification dans l'évolution, ses variations au cours du développement, son rôle dans la régulation métabolique et enfin ses aspects pathologiques et diagnostiques.

LES CAUSES DE LA MULTIPLICITÉ ENZYMATIQUE

Les causes de la multiplicité enzymatique peuvent être divisées en deux catégories : les causes primaires ou génétiques et les causes secondaires ou post-synthétiques (fig. 1).

Les causes génétiques font intervenir l'existence de plusieurs gènes. Une première possibilité pour ces gènes est d'occuper des *loci* différents, par exemple, un *locus* A et un *locus* B. Le *locus* A contient l'information nécessaire à la

synthèse d'une protéine A qui peut être soit un isoenzyme, soit une sous-unité d'isoenzyme si celui-ci est oligomérique. Le *locus* B conduit à la synthèse d'une protéine B. Nous reviendrons sur le cas des enzymes oligomériques.

Il existe une seconde possibilité. Chez un individu diploïde, les chromosomes vont par paires, et pour un *locus* donné, les deux gènes homologues peuvent être des variétés alléliques, l'allèle 1 et l'allèle 2. Les deux allèles correspondant à un enzyme sont en général codominants, ce qui conduit à la synthèse de deux types de protéines A₁ et A₂.

Les différentes formes de types alléliques d'un enzyme ont souvent une activité enzymatique semblable et diffèrent seulement par leur mobilité électrophorétique. L'existence d'allèles multiples permet d'expliquer des différences individuelles dans une population.

En l'absence de causes génétiques, c'est-à-dire s'il n'y a qu'une seule sorte de gène, la multiplicité enzymatique s'explique par des modifications post-synthétiques. Ces modifications covalentes peuvent se faire de plusieurs façons, par exemple par addition d'un hydrate de carbone, par protéolyse limitée ou par modification d'une chaîne latérale d'un acide aminé. Pour qu'il y ait des isoenzymes, il faut que les altérations post-synthétiques n'affectent qu'une partie de la population de l'enzyme de façon telle que la forme modifiée A' et la forme non modifiée A coexistent dans un même organisme. Seules les formes d'un enzyme qui sont de nature permanente sont considérées comme des isoenzymes, les formes transitoires intervenant dans les mécanismes de réaction et de régulation ne sont pas des isoenzymes.

Les trois causes de multiplicité enzymatique que nous venons de décrire n'interviennent pas toujours isolément ce qui peut conduire à des situations complexes. Ajoutons à cela que si l'enzyme est de nature oligomérique et qu'il existe plusieurs types de sous-unités pour une ou l'autre des causes décrites, plusieurs combinai-

(1) Leçon publique du Doctorat spécial en Sciences biomédicales expérimentales faite à l'Université de Liège, le 11 mai 1981.

(2) Chef de Travaux, Université de Liège, Laboratoire de Physiologie et de Biochimie générales de l'Institut supérieur d'Éducation physique (Pr. C. Liébecq).

sons entre sous-unités sont possibles ce qui augmente le nombre d'isoenzymes. Par exemple, s'il y a deux sortes de sous-unités représentées à la figure 2 par des disques noirs et blancs, on voit qu'il y a une famille de trois isoenzymes dans le cas d'un dimère, par exemple, la créatine-kinase des Vertébrés, quatre dans le cas d'un trimère, par exemple, l'ornithine-carbamoyl-transférase de *Escherichia coli* et cinq

dans le cas d'un tétramère, par exemple, la lactate-déshydrogénase des Vertébrés. Dans ces trois exemples, les deux sous-unités résultent de l'existence de deux *loci*. Dans une famille d'isoenzymes, les proportions des différents oligomères dépendent de la proportion relative des sous-unités présentes, les isoenzymes les plus riches en sous-unité prédominante étant les plus abondants.

Causes génétiques	Loci multiples	DNA — ----- — ----- — ↓ ↓ Enzyme (A) (B)
	Allèles multiples	DNA paternel — ----- — Allèle 1 DNA maternel — ----- — Allèle 2 ↓ ↓ (A1) (A2)
Causes post-synthétiques		(A) — Modifications covalentes → (A')

FIG. 1. Causes de la multiplicité enzymatique (d'après RIDER et TAYLOR, 1)

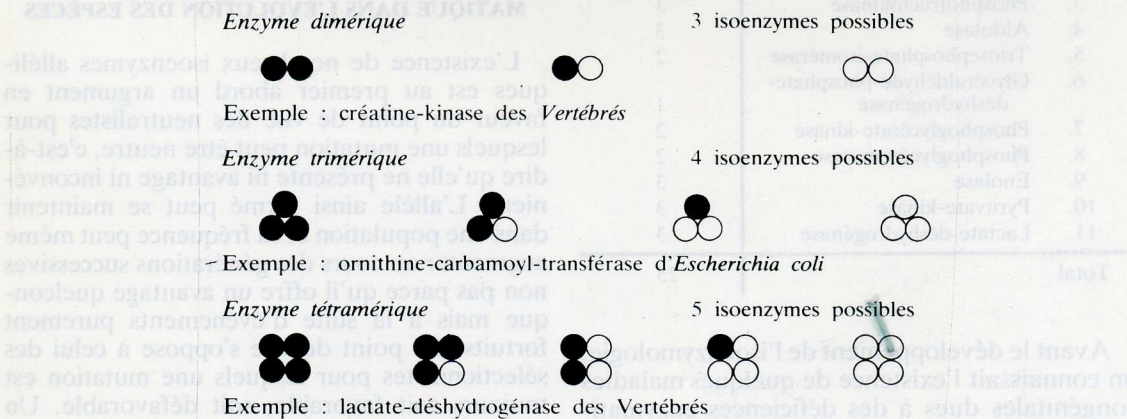


FIG. 2. Familles d'isoenzymes. Combinaisons entre deux sortes de sous-unités (d'après RIDER et TAYLOR, 1).

IMPORTANCE DES ISOENZYMES EN GÉNÉTIQUE

L'existence d'isoenzymes d'origine génétique a, d'une part, une incidence sur le plan des idées, et d'autre part, un intérêt pratique non négligeable. Sur le plan des concepts, tout d'abord, on pensait qu'à un enzyme correspondait un gène alors qu'on sait maintenant qu'un gène programme une sous-unité d'un isoenzyme et qu'à un enzyme donné correspondent en général plusieurs gènes. Par exemple, les enzymes de la glycolyse des tissus de Mammifères (tableau I) sont codés pour la plupart par deux ou trois *loci*, de sorte que le nombre de *loci* génétiques requis pour la glycolyse, 25, est plus du double du nombre d'étapes catalytiques, 11. Si toutes les voies métaboliques présentent un degré d'hétérogénéité analogue, on peut estimer qu'à chaque réaction catalysée par un enzyme correspond non pas un *locus* mais une moyenne de deux *loci*. Le nombre de gènes est donc plus élevé que prévu, ce qui implique aussi une plus grande complexité du contrôle de leur expression.

TABLEAU I. Nombre estimé de *loci* indépendants pour les enzymes glycolytiques de Mammifères (d'après RIDER et TAYLOR, 1)

Enzyme	Nombre estimé de <i>loci</i>
1. Hexokinase/glucokinase	2
2. Glucosephosphate-isomérase	1
3. Phosphofructokinase	3
4. Aldolase	3
5. Triosephosphate-isomérase	2
6. Glyceraldéhyde-phosphate-déshydrogénase	1
7. Phosphoglycérate-kinase	2
8. Phosphoglycéromutase	2
9. Enolase	3
10. Pyruvate-kinase	3
11. Lactate-déshydrogénase	3
Total	25

Avant le développement de l'isoenzymologie, on connaissait l'existence de quelques maladies congénitales dues à des déficiences enzymatiques liées à l'apparition par mutation d'allèles nuisibles. Etant donné qu'on ne détectait que ces allèles nuisibles, on pensait que les gènes

présentant des variétés alléliques devaient être très rares. L'analyse des enzymes par électrophorèse a montré que de nombreux enzymes présentent le phénomène de polymorphisme, c'est-à-dire des variations de structure dues à l'existence d'allèles multiples. Sur 71 *loci* d'enzymes examinés dans la population européenne, on a découvert un polymorphisme pour 20 d'entre eux. En fait, ce nombre est probablement sous-estimé car il ne concerne que les isoenzymes alléliques séparables par électrophorèse. Au niveau d'une population, le nombre d'allèles possibles pour un *locus* donné peut être très élevé ainsi qu'on l'a constaté par exemple chez la drosophile pour la xanthine-déshydrogénase. Par la méthode d'électrophorèse usuelle, on a mis en évidence 6 allèles pour ce *locus*, mais des méthodes plus raffinées ont révélé un total de 37 allèles. La probabilité de trouver deux individus possédant la même combinaison d'allèles pour l'ensemble de ses enzymes est tellement faible que chaque individu possède une collection d'isoenzymes unique qui le caractérise comme une empreinte digitale.

L'intérêt pratique des isoenzymes en génétique n'est plus à démontrer. Nous signalerons seulement que ce sont des marqueurs spécifiques, que leurs allèles sont généralement codominants et que les mutations sont fréquentes et rarement nuisibles.

LA SIGNIFICATION DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE DANS L'ÉVOLUTION DES ESPÈCES

L'existence de nombreux isoenzymes alléliques est au premier abord un argument en faveur du point de vue des neutralistes pour lesquels une mutation peut être neutre, c'est-à-dire qu'elle ne présente ni avantage ni inconvénient. L'allèle ainsi formé peut se maintenir dans une population et sa fréquence peut même augmenter au cours des générations successives non pas parce qu'il offre un avantage quelconque mais à la suite d'événements purement fortuits. Ce point de vue s'oppose à celui des sélectionnistes pour lesquels une mutation est toujours soit favorable, soit défavorable. Un allèle favorable se maintient dans la population tandis qu'un allèle défavorable est progressivement éliminé. Les deux allèles peuvent toute-

fois coexister de manière transitoire. De plus, il peut se faire que l'hétérozygotisme présente un avantage. Un exemple classique est fourni par une protéine non enzymatique, l'hémoglobine. Le génotype homozygote normal Hb^A Hb^A ne confère pas une résistance à la malaria. Un génotype homozygote de type Hb^S Hb^S est responsable de l'anémie « falciforme » qui conduit à une mort précoce. Par contre, le génotype hétérozygote Hb^A Hb^S peut être avantageux car il confère une résistance aux complications de la malaria et ne cause que des problèmes respiratoires mineurs. C'est pourquoi l'allèle Hb^S bien que responsable d'une anémie grave n'a pas été éliminé des populations humaines exposées à la malaria. On voit donc que le maintien d'un polymorphisme ne démontre pas nécessairement la thèse des neutralistes.

Neutralistes et sélectionnistes ont donc recherché dans l'important polymorphisme enzymatique des indications en faveur de leur point de vue respectif. Actuellement, il semble bien que la thèse des sélectionnistes soit justifiée dans de nombreux cas, mais on s'accorde à penser que les neutralistes détiennent aussi une

partie de la vérité. Les deux processus d'évolution, celui dû à la sélection et celui dû au hasard, joueraient donc un rôle dans l'existence des isoenzymes alléliques.

En ce qui concerne l'existence de *loci* multiples, on considère que les isoenzymes qui en résultent ont toujours un rôle physiologique et ne se sont pas imposés de manière fortuite.

De nombreuses études tentent d'élucider les mécanismes de formation et d'évolution d'un *locus*. Il est intéressant pour cela de comparer les isoenzymes des différentes espèces et de retracer l'évolution des isoenzymes au cours de la phylogénèse. Ce dernier aspect sera sommairement illustré par l'exemple des hexokinases (fig. 3). Le foie des Mammifères contient quatre hexokinases qui apparaissent dans le profil chromatographique. Le pic D correspond à l'isoenzyme appelé glucokinase. On voit que les Amphibiens et les Chéloniens possèdent également une glucokinase alors que les Reptiles supérieurs et les Oiseaux n'en possèdent pas. On peut donc supposer, qu'au niveau de la lignée conduisant aux Oiseaux et Reptiles supérieurs, il y a eu une mutation responsable de la perte ou de la répression permanente de la glucokinase.

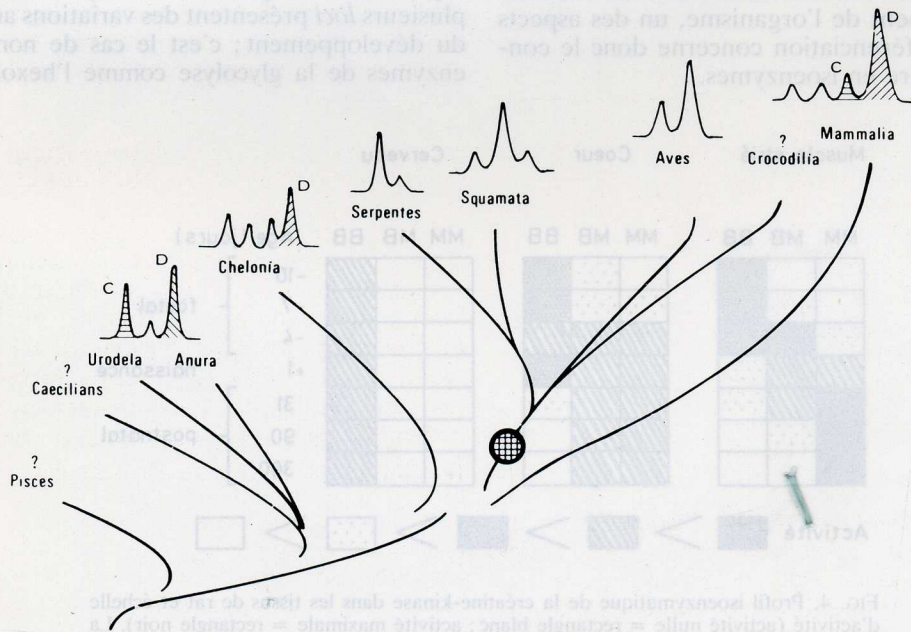


FIG. 3. Schéma simplifié de l'évolution des hexokinases de foie (d'après URETA, 2).

COMPARAISON DU CONTENU ISOENZYMATIQUE DES DIFFÉRENTS TISSUS ET VARIATIONS DE CE CONTENU AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

Chez un individu hétérozygote, les deux allèles sont en général codominants. Les isoenzymes qui en résultent se rencontrent donc ensemble dans les tissus où ils se trouvent. Par contre, deux gènes situés sur des *loci* indépendants peuvent être exprimés de façon différente. C'est ainsi que la glucokinase, un des isoenzymes de l'hexokinase, ne se rencontre en quantité significative que dans le foie. Enfin, deux isoenzymes d'origine post-synthétique peuvent aussi présenter une spécificité tissulaire. Par exemple, un des *loci* de la pyruvate-kinase des Mammifères conduit à la présence de sous-unités de type L dans le foie et de type L' dans les érythrocytes. C'est en fait L' qui est synthétisé dans les deux tissus mais, dans le foie, il est rapidement modifié par clivage protéolytique. Il est cependant assez rare qu'un isoenzyme se rencontre exclusivement dans un tissu. Plus généralement, ce sont les proportions entre les isoenzymes catalysant une même réaction qui sont caractéristiques d'un tissu donné. Ces tissus proviennent d'une seule cellule fertilisée et se sont différenciés au cours du développement de l'organisme, un des aspects de cette différenciation concerne donc le contenu tissulaire en isoenzymes.

La figure 4 montre, à titre d'exemple, l'évolution de la créatine-kinase de rat. La créatine-kinase est un dimère déterminé par deux *loci* génétiques produisant deux sortes de sous-unités, une sous-unité M (M pour *muscle*) et une sous-unité B (B pour *brain*), ce qui donne lieu à trois isoenzymes MM, MB et BB. La plupart des tissus ne contiennent que l'isoenzyme BB aussi bien à l'état fœtal qu'à l'état adulte, ces tissus ne présentent donc pas d'intérêt ontologique en ce qui concerne cet enzyme. C'est par exemple le cas du cerveau. Dans le muscle strié et dans le cœur, les isoenzymes changent au cours du développement. Dans ces deux tissus, l'isoenzyme BB est le composant majeur au début de la vie fœtale ; les deux autres isoenzymes apparaissent au cours du développement. Les trois formes coexistent au moment de la naissance. L'isoenzyme BB a complètement disparu chez l'adulte. Seule la forme MM subsiste dans le muscle strié de l'adulte tandis que, dans le cœur, les formes MB et MM coexistent. On s'est aperçu que l'apparition des sous-unités de type M est associée à la formation des éléments contractiles du muscle. L'enzyme MM peut se fixer sur des sites spécifiques au niveau des myofibrilles. En général, les enzymes codés par plusieurs *loci* présentent des variations au cours du développement ; c'est le cas de nombreux enzymes de la glycolyse comme l'hexokinase,

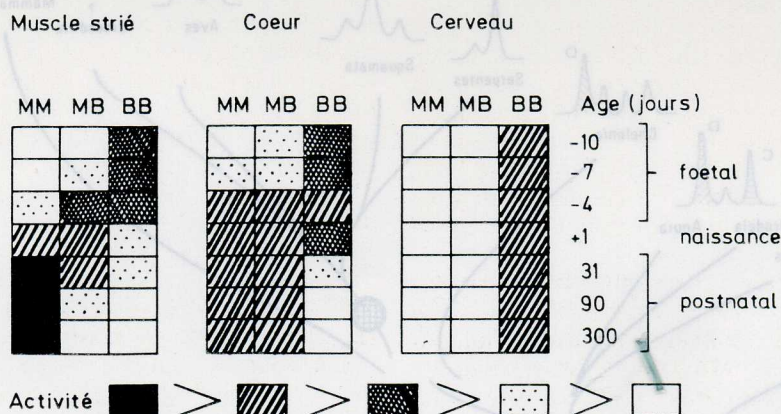


FIG. 4. Profil isoenzymatique de la créatine-kinase dans les tissus de rat et échelle d'activité (activité nulle = rectangle blanc ; activité maximale = rectangle noir). La créatine-kinase est un dimère constitué de deux sortes de sous-unités, une sous-unité M (M pour *muscle*) et une sous-unité B (B pour *brain*) (d'après DAWSON et coll., 3).

l'aldolase, l'énolase, la pyruvate-kinase et la lactate-déshydrogénase.

RÔLE DES ISOENZYMES DANS LA RÉGULATION MÉTABOLIQUE

Le fait d'observer des changements de proportions entre les isoenzymes au cours de la différenciation des tissus qui s'accompagne d'une différenciation métabolique, suggère que les isoenzymes jouent un rôle dans la régulation métabolique. Les isoenzymes peuvent différer les uns des autres par pratiquement n'importe quelle propriété, et bien que certaines d'entre elles aient des implications métaboliques plus évidentes que d'autres, n'importe quelle différence est susceptible d'influencer la manière dont l'enzyme fonctionne *in vivo*. Parmi les quatre isoenzymes de l'hexokinase de foie de Mammifères, trois ont un K_m (¹) petit (0,1 mM) pour le D-glucose et le quatrième, appelé plus communément glucokinase, a un K_m 100 fois plus élevé. La glucokinase agit spécifiquement sur le D-glucose et le D-mannose alors que les autres hexokinases agissent aussi sur d'autres hexoses de la série D. La glucokinase n'est pas inhibée par le glucose-6-phosphate (effecteur allostérique) contrairement aux autres isoenzymes. La synthèse de la glucokinase est stimulée par l'insuline. Se basant sur les propriétés particulières de la glucokinase, on voit que sa présence est requise dans un tissu où la concentration en glucose peut être élevée et où le stockage du glucose est important, ce qui est en accord avec le fait que la glucokinase se trouve uniquement dans le foie. En ce qui concerne la localisation subcellulaire, un bel exemple nous est fourni par la malate-déshydrogénase et la glutamate-oxaloacétate-transaminase qui possèdent des isoenzymes cytosoliques et mitochondriaux.

La justification de l'existence des isoenzymes par un rôle métabolique est une tentative difficile et reste le plus souvent à un niveau élémentaire. C'est une tentative périlleuse parce qu'on risquerait, entre autres, d'attribuer un rôle à des

différences constatées *in vitro* mais qui n'interviennent pas dans des conditions physiologiques. Cette mésaventure s'est produite dans le cas de la lactate-déshydrogénase qui est une série de cinq isoenzymes tétramériques constitués de deux sortes de sous-unités, les sous-unités H (*heart*) et M (*muscle*) provenant de deux *loci* indépendants. Les cinq isoenzymes coexistent aussi bien dans le cœur que dans le muscle strié, mais dans le cœur, c'est l'isoenzyme H_4 qui domine, alors que dans le muscle strié, c'est l'isoenzyme M_4 qui domine. On a constaté *in vitro* à 25° C que l'isoenzyme H_4 caractéristique du cœur est beaucoup plus susceptible d'être inhibé par le pyruvate que l'isoenzyme M_4 et on a donc prétendu que le rôle de cette inhibition est d'empêcher une production excessive d'acide lactique dans les tissus aérobiques, en particulier dans le cœur, alors que la production d'acide lactique n'est pas inhibée dans le muscle qui doit pouvoir fonctionner en anaérobiose et où l'isoenzyme M_4 prédomine. Cette interprétation simple qui est souvent citée en exemple est malheureusement douteuse pour plusieurs raisons : d'abord parce que les concentrations en pyruvate qu'il faut atteindre pour observer une inhibition de l'isoenzyme H_4 ne sont probablement jamais atteintes dans le cœur, ensuite parce qu'à température normale, la différence de comportement des deux isoenzymes vis-à-vis du pyruvate s'estompe fortement et qu'enfin, si on travaille avec des concentrations en enzymes relativement élevées pour se rapprocher de leurs concentrations intracellulaires, l'inhibition par le pyruvate s'affaiblit. Nous ajouterons qu'on a cité le cas d'un homme de 64 ans qui, à cause d'un défaut génétique, ne possédait pas d'isoenzyme H_4 dans son cœur sans en être affecté. Cette observation montre que l'existence de deux *loci* indépendants peut présenter l'avantage de minimiser les répercussions d'un accident génétique affectant un des *loci* ou la régulation de son expression.

Un exemple tout différent et moins équivoque concerne le contrôle de la synthèse des acides aminés chez *Escherichia coli* (fig. 5). La phosphorylation de l'aspartate est le point de départ de trois voies métaboliques qui conduisent respectivement à la lysine, la méthionine et la thréonine. Cette étape est catalysée par trois

(¹) K_m ou constante de Michaelis est la concentration du substrat qui assure une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maximale. Une constante de Michaelis élevée signifie une affinité faible pour le substrat.

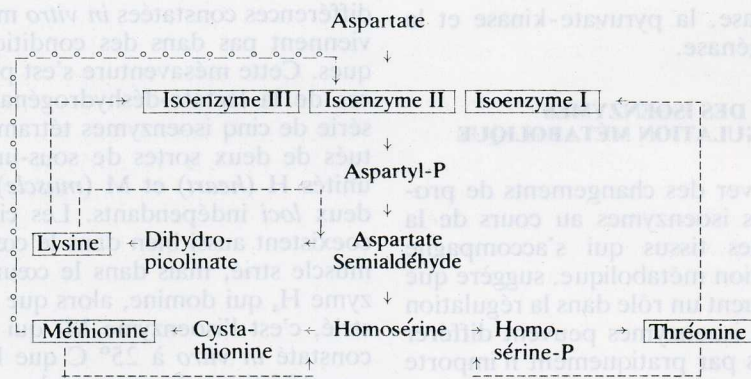


FIG. 5. Rôle des aspartokinases (isoenzymes I, II, III) dans la régulation de la synthèse des acides aminés chez *Escherichia coli* (d'après RIDER et TAYLOR, 1).

Inhibition de l'activité de l'enzyme

Répression de la synthèse de l'enzyme

isoenzymes, les aspartokinases I, II et III. On a constaté que l'aspartokinase I est sélectivement inhibée par la thréonine, que la synthèse de l'aspartokinase II est réprimée par la méthionine et que l'aspartokinase III est directement inhibée par la lysine. De plus, chaque produit inhibe la première étape de l'embranchement qui y conduit. On pourrait croire que, dans ces conditions, chaque produit n'inhibe que sa propre synthèse sans affecter la synthèse des deux autres. Cependant, pour que la séparation des trois voies métaboliques soit efficace, il faut en plus supposer une microcompartimentation de leurs intermédiaires communs. En effet, si l'aspartylphosphate produit par les trois aspartokinases se mélangeait dans un *pool* commun, cela enlèverait beaucoup de signification à l'existence des trois isoenzymes. Par contre, si on admet l'existence de trois complexes polyenzymatiques distincts, chacun synthétisant un produit particulier, lysine, méthionine ou thréonine, on aura une microcompartimentation des intermédiaires puisqu'ils seront séquestrés dans des complexes distincts; on aura alors une séparation effective des trois voies métaboliques et une justification évidente des trois isoenzymes de l'aspartokinase. Comme première indication de la vraisemblance de cette proposition, on a mis en évidence l'existence de deux isoenzymes de l'homosérine-déshydrogénase dont un semble être associé à l'aspartokinase I et ferait donc partie du complexe qui

synthétise la thréonine, le second semble être associé à l'aspartokinase II et ferait donc partie du complexe qui synthétise la méthionine.

L'existence de complexes polyenzymatiques pour justifier la présence simultanée de plusieurs isoenzymes dans un même compartiment subcellulaire n'est encore qu'une hypothèse, elle a été développée récemment par Tito Ureta (2). Cette hypothèse est séduisante à plus d'un égard car elle justifie aussi l'existence d'isoenzymes au niveau d'étapes non régulatrices ainsi que l'existence d'isoenzymes isocinétiques, c'est-à-dire ayant les mêmes propriétés cinétiques et régulatrices.

ASPECTS PATHOLOGIQUES ET DIAGNOSTIQUES DE LA MULTIPLICITÉ ENZYMATIQUE

En tant que produits génétiques primaires et marqueurs spécifiques de différenciation, les isoenzymes présentent un intérêt certain pour caractériser les anomalies des tissus cancéreux. Les nombreuses observations, faites principalement sur les enzymes de la glycolyse dans des tumeurs expérimentales du foie, peuvent se résumer de la façon suivante : on observe que le profil des isoenzymes d'un tissu cancéreux diffère de celui des tissus normaux adultes et se rapproche du profil fœtal. On ne sait pas s'il faut attribuer ce glissement à la différenciation cellulaire des tumeurs ou à leur croissance tissulaire, deux caractéristiques qui les rappro-

