

RÉPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

**PURIFICATION DES PROTÉINES PAR ÉLECTROPHORÈSE.
APPLICATION AUX IZOENZYMES
DE LA LACTICODÉSHYDROGÉNASE.**

MÉMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le 2 Décembre 1979

devant L'ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

par

Madame SACKHO Assitan W. SACKO

Pour obtenir le Diplôme d'État de Pharmacie

M M. les Professeurs J. JOSSELIN

Président

S. SANGARE
F. MIRANDA
Docteur I.M. TOURE

} Examineurs

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE ACADEMIQUE 1978 - 1979

Directeur Général	: Professeur Aliou BA
Directeur Général Adjoint	: Professeur Bocar SALL
Secrétaire Général	: Monsieur Godefroy COULIBALY
Conseiller Technique	: Professeur Philippe RANQUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Bernard BLANC	: Gynécologie-Obstétrique
Professeur Sadio SYLLA	: Anatomie-Dissection
Professeur André MAZER	: Physiologie
Professeur Jean-Pierre BISSET	: Biophysique
Professeur François MIRANDA	: Biochimie
Professeur Michel QUILICI	: Immunologie
Professeur Humbert GIONO-BARBER	: Pharmacodynamie
Professeur Jacques JOSSELIN	: Biochimie
Professeur Oumar SYLLA	: Chimie organique
Professeur GRAS	: Toxicologie-Hydrologie
Docteur Bernard LANDRIEU	: Biochimie
Docteur J.P. REYNIER	: Pharmacie Galénique
Docteur Mme P. GIONO-BARBER	: Anatomie-Physiologie Humaines
Docteur Mme Thérèse FARES	: Anatomie-Physiologie Humaines
Docteur EMile LOREAL	: O.R.L.
Docteur Jean DELMONT	: Santé Publique

PROFESSEURS TITULAIRES RESIDANT A BAMAKO

Professeur Aliou BA	: Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	: Orthopédie-Traumatologie-Anatomie
Professeur Mamadou DEMBELE	: Chirurgie Générale
Professeur Mohamed TOURE	: Pédiatrie
Professeur Souleymane SANGARE	: Pneumo-Phtisiologie
Professeur Mamadou KOUMARE	: Pharmacologie-Matières Médicales
Professeur P. SAINT-ANDRE	: Dermatologie-Vénérologie-Léprologie
Professeur Philippe RANQUE	: Parasitologie-Zoologie
Professeur Bernard DUFLO	: Pathologie Médicale-Thérapeutique

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Aly GUINDO	: Sémiologie Digestive
Docteur Abdoulaye AG-RHALY.	: Sémiologie Rénale
Docteur Sory KEITA	: Microbiologie
Docteur Yaya FOFANA	: Microbiologie
Docteur Moctar DIOP	: Sémiologie Chirurgicale
Docteur Balla COULIBALY	: Pédiatrie - Médecine du Travail
Docteur Bénitiéni FOFANA	: Obstétrique
Docteur Mamadou Lamine TRAORE	: Gynécologie-Obstétrique-Méd.Légale
Docteur Boubacar CISSE	: Dermatologie
Docteur Yacouba COULIBALY	: Stomatologie
Docteur Sidi Yaya SIMAGA	: Santé Publique
Docteur Sanoussi KONATE	: Santé Publique
Docteur Issa TRAORE	: Radiologie
Docteur Mamadou Kouréïssi TOURE	: Sémiologie Cardio-Vasculaire
Docteur Siné BAYO	: Histologie-Embryologie-Anapath.
Madame KEITA (Oulématou) BA	: Biologie Animale
Madame DIABY	: Santé Familiale
Monsieur Cheick Tidiani TANDIA	: Hygiène du Milieu

CHARGES DE COURS

Docteur L. AVRAMOV	: Psychiatrie
Docteur Christian DULAT	: Microbiologie
Docteur Patrick DEFONTAINE	: Physiologie-Anesthésie-Réanimation
Docteur Marie-Colette DEFONTAINE	: Gynécologie-Hématologie
Docteur Isack Mamby TOURE	: Microbiologie
Docteur Gérard TRUSCHEL	: Anatomie-Traumatologie-Sémio.Chir.
Docteur Henri DUCAM	: Pathologie Cardiovasculaire
Docteur Boukassoum HAIDARA	: Galénique-Chimie Organique
Docteur Elisabeth ASTORQUIZA	: Epidémiologie
Docteur Hamady Modi DIALL	: Chimie Analytique
Docteur Brigitte DUFLO	: Sémiologie digestive
Professeur Tiémoko MALLET	: Mathématiques
Professeur Alévé GUINDO	: Mathématiques
Professeur Amadou Baba DIALLO	: Physique
Professeur N'Golo DIARRA	: Botanique-Cryptogamie-Biologie Végét.
Professeur Ibrahima TOURE	: Physique
Professeur Lassana KEITA	: Physique
Professeur Souleymane TRAORE	: Physiologie Générale
Professeur Daouda DIALLO	: Chimie Générale - Minérale

A MON MARI,

Pour ton sentiment ardent mais serein.

A MON PERE,

Amour filial.

A MA MERE,

*Mes meilleures pensées. Témoinage du respectueux
dévouement de tous tes enfants. Longévité.*

A TOUS MES FRERES ET SOEURS,

Fraternelle considération.

A TOUS MES COUSINS ET COUSINES, A TOUS MES PROCHES PARENTS,

*Reconnaissance pour votre attention
parentale.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR HAIDARA B.,

*Pour ton soutien moral. Fraternelle
gratitude.*

A MONSIEUR ET MADAME HAIDARA C.M.,

Respectueux attachement. Heureux ménage.

A MONSIEUR ET MADAME NIAMBELE,

Fidèle amitié.

AUX FAMILLES TRAORE, TOURE, DEMBELE et TOUNKARA,

*Pour la courtoisie, la gentillesse de
leur accueil.*

A TOUTE LA PROMOTION 1974-1979 DE L'ECOLE NATIONALE DE
MEDECINE ET DE PHARMACIE,

Courage dans la vie.

Que le Professeur JOSSELIN, qui a accepté de présider ce Jury trouve ici l'expression de ma vive gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur SANGARE et Monsieur le Docteur TOURE d'avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur le Professeur MIRANDA, m'a accueillie dans le laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine (Secteur Nord de Marseille) : ses conseils et ses encouragements ont été déterminants pour la réalisation de ce travail.

Monsieur le Docteur GRANIER, par sa grande compétence dans le domaine de la Biochimie Clinique et par son dynamisme, m'a aidée à mener à bien l'expérimentation. Une pensée toute particulière va à Monsieur J.P. ROSSO et Madame M-F. MARTIN, sans leur aimable assistance, il m'aurait été difficile d'accomplir ce travail.

Je ne saurais commencer cet exposé sans remercier au préalable tous mes camarades du Laboratoire qui n'ont ménagé aucun effort pour rendre agréable l'ambiance au sein de laquelle j'ai travaillé.

J'exprime ma très sincère reconnaissance au Professeur A. BA et à tout le Personnel de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de Bamako.

L'association des Anciens Externes de Marseille, a procédé à la frappe de ce mémoire, je lui en sais profondément gré.

S O M M A I R E

	Pages
1 - <u>INTRODUCTION : METHODES DE SEPARATION DES PROTEINES</u>	1
1.1. Cristallisation	2
1.2. Solubilité différentielle	2
1.3. Chromatographie sur échangeurs d'ions	2
1.4. Filtration sur tamis moléculaire.	2
1.5. Chromatographie sur adsorbant spécifique	3
1.6. Electrophorèse.	3
2 - <u>GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES</u>	5
3 - <u>DIFFERENTES TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE DES PROTEINES</u>	8
3.1. Electrophorèse en veine liquide.	9
3.2. Electrophorèse de zones.	9
3.2.1. Electrophorèse sur papier	9
3.2.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose	10
3.2.3. Electrophorèse sur gel d'amidon	10
3.2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	11
3.2.5. Immuno-électrophorèse.	12
4 - <u>LES LACTICO-DESHYDROGENASES</u>	13
4.1. Aperçu biologique sur l'enzyme.	14
4.2. Matériels	24
4.2.1. Choix des sérums	24
4.2.2. Conditions d'électrophorèse	26
4.2.3. Coloration	26
4.2.4. Densitométrie	27
4.3. Méthodes	27
4.3.1. Echantillonnage.	27
4.3.2. Comparaison avec les protéines plasmati-	31
ques	

	Pages
4.3.3. Conditions de dépôts, de migration et de densitométrie	31
4.4. Résultats et discussion	31
5 - <u>CONCLUSION GENERALE</u>	37

BIBLIOGRAPHIE.

1 - I N T R O D U C T I O N

METHODES DE SEPARATION DES PROTEINES

L'importance que revêt l'étude des protéines en biologie est exempte de toute discussion dans la mesure où, non seulement elles représentent plus de 50 % du poids sec du corps humain (environ 56 %), mais plus encore elles sont douées des propriétés biologiques les plus variées, grâce aux infinies possibilités de combinaison que permettent leur vingt amino-acides constitutifs. C'est pourquoi, il n'est pas surprenant que tous les enzymes soient des protéines et que la majorité des hormones et beaucoup de toxines soient également de nature protéidique. Etant donné l'abondance de la littérature consacrée au rôle physiologique primordial des hormones et des enzymes au sein de l'organisme, il est superflu d'insister sur cet aspect.

Notre étude va donc porter sur un domaine bien délimité qui est la purification des protéines et, plus spécialement, les méthodes de purification par électrophorèse. Elles ne sont évidemment pas les seules utilisées pour obtenir une séparation de ces composés :

1.1. Dans les débuts de la chimie organique, la cristallisation fut le premier mode de purification utilisé. Actuellement, elle constitue le point de départ des méthodes radiocristallographiques permettant de déterminer la structure tridimensionnelle des protéines.

1.2. Les techniques de solubilité différentielle (relargage) sont exploitées par l'industrie afin de préparer de grandes quantités de protéines (obtention de différentes fractions plasmatiques).

1.3. La chromatographie sur échangeurs d'anions ou de cations, tout en gardant des possibilités préparatives intéressantes, est généralement douée d'un pouvoir de résolution plus élevé que la méthode précédente.

1.4. La filtration sur des tamis moléculaires : Séphadex (dextrane modifié), Biogel (polyacrylamide) et autres, est un complément utile à la chromatographie d'échange d'ions, son principe de base étant totalement distinct.

1.5. La dernière née des techniques chromatographiques est la chromatographie sur adsorbant spécifique ou chromatographie d'affinité : c'est évidemment la plus résolutive de ce type de techniques, mais, étant donné le coût du support chromatographique, celle qui a les moins grandes possibilités préparatives.

1.6. L'électrophorèse est l'une des méthodes les plus couramment utilisées à l'heure actuelle en biochimie clinique. Elle est également très employée en recherche fondamentale pour la séparation des protéines et des peptides. Mais ses performances préparatives restent limitées.

L'électrophorèse trouve son application dans diverses analyses médicales concernant les protéines : ensemble des fractions protéiques du sérum, glycoprotéines, lipoprotéines, hémoglobines, constituants des groupes sériques (céruléoplasmines, haptoglobines, transferrines), isoenzymes (créatine phosphokinases ou C.P.K. ou C.K., lactico-déshydrogénases ou L.D.H.). Enfin, la combinaison des phénomènes d'électrophorèse et d'immuno-précipitation a permis la mise au point de la méthode d'immuno-électrophorèse dont le caractère hautement spécifique est du même ordre que celui de la chromatographie d'affinité.

Le temps limité dont nous disposons pendant notre stage nous a tout de même permis de nous livrer à une expérimentation originale sur le dosage des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase en utilisant, comme support d'électrophorèse, l'acétate de cellulose. Avant d'exposer nos résultats, nous présenterons un bref aperçu sur l'ensemble des techniques d'électrophorèse.

Grâce à la variété des structures des résidus d'acides aminés, dont plusieurs portent des charges électriques positives ou négatives, on imagine aisément les différences de charge nette qui pourront exister entre les diverses protéines se trouvant dans un milieu naturel : ainsi, sous l'influence d'un champ électrique, ces protéines se déplaceront à des vitesses variables en fonction de leur charge nette (il n'existe qu'une circonstance exceptionnelle où la protéine ne se déplace pas : c'est lorsque le pH du tampon dans lequel elle est dissoute est identique au pH isoélectrique de la pro-

téine ; ceci revient à admettre que sa charge nette est alors nulle). C'est sur ce principe physico-chimique qu'est basée la technique d'électrophorèse qui se pratique selon trois modalités principales :

- électrophorèse en veine liquide et sa variante moderne : l'électrophorèse en flux continu ;
- électrophorèse de zone ;
- électrofocalisation (qui sera omise dans la suite de l'exposé).

2 - GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

Placées dans un champ électrique, les molécules protéiques auront une mobilité qui sera fonction de leur pH_i et sera, en théorie, différente d'une protéine à l'autre. L'électrophorèse permet ainsi de séparer les protéines d'un mélange avec une résolution relativement bonne. Elle est très utilisée en analyse, soit sur support solide (papier, amidon, agarose, acétate de cellulose, gel de polyacrylamide), soit en veine liquide.

L'électrophorèse est un phénomène physico-chimique qui rend compte du déplacement d'ions ou de particules chargées électriquement, en solution ou en suspension, sous l'influence d'un champ électrique. L'électrophorèse des protéines des liquides biologiques correspond au déplacement de macromolécules en pseudo-solution colloïdale. Ce déplacement s'effectue en fonction de la mobilité des protéines sous l'influence d'un champ électrique. Par définition, la mobilité (U) s'exprime par :

$$U = \frac{v}{H}$$

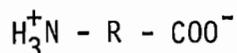
où

v = vitesse de la protéine (cm/sec)

H = champ électrique (volt/cm)

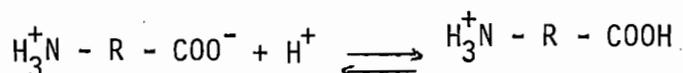
U = mobilité ($\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{volt}^{-1}$)

Au pH isoélectrique, les charges + et - de la protéine sont en équilibre :



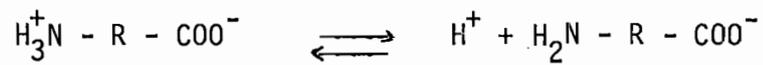
la mobilité est nulle.

Pour un pH acide, situé au-dessous du pH_i , le comportement de la protéine est tel qu'elle devient un accepteur de protons, donc une molécule basique :



elle se dirige vers la cathode : la valeur de sa mobilité sera affectée du signe +.

Au-dessus du pH_i , le phénomène inverse se produit ; la protéine se comporte comme un donateur de protons :



elle se dirige vers l'anode : la valeur de sa mobilité sera affectée du signe -.

D'autres facteurs ont une influence sur la mobilité électrophorétique : par exemple, la forme et les dimensions de la protéine faisant intervenir les structures primaire, secondaire et tertiaire (la protéine a une charge réelle Q_r et une charge apparente Q_a , cette dernière se manifestant dans l'expérience) ; de même, les interactions de la protéine avec la solution tampon qui est caractérisée non seulement par son pH, sa force ionique μ , mais aussi par la nature de ses ions constitutifs.

3 - DIFFERENTES TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

3.1. Electrophorèse en veine liquide :

L'électrophorèse en veine liquide ou de frontières mouvantes a été la première forme d'électrophorèse utilisée. Elle a été mise au point par TISELIUS, ce qui valut à ce dernier le prix Nobel. La cellule d'électrophorèse, en forme de U, comporte une branche transversale horizontale reliant deux branches verticales. On choisit le tampon d'électrophorèse de telle manière que les protéines du mélange migrent toutes dans le même sens (par exemple, avec un tampon véronal de pH 8,6, toutes les protéines plasmatiques migreront vers l'anode). La branche verticale reliée à la cathode dans laquelle les protéines se déplacent constamment vers le bas est la branche descendante. La branche verticale reliée à l'anode dans laquelle les protéines se déplacent constamment vers le haut est la branche ascendante. On dose les différentes protéines constitutives du mélange par mesure de l'indice de réfraction qui montre, en même temps, le déplacement des frontières, caractéristique d'une protéine donnée.

Dans la version plus moderne que représente l'électrophorèse en flux continu, le mélange de protéines à séparer est déposé de façon continue entre deux plaques de verre très voisines l'une de l'autre afin de limiter les phénomènes de diffusion (espacement entre les plaques inférieur à 1 mm). Parallèlement, à l'arrivée de la solution protéique se fait un écoulement constant de tampon, l'ensemble de ces flux étant régulé par des pompes. La séparation se fait ici aussi sous l'influence du champ électrique qui est disposé perpendiculairement au flux de liquide. La collection des fractions s'opère dans une série de tubes disposée à la base des plaques de verre.

3.2. Electrophorèse de zones :

Dans l'électrophorèse de zones, la solution de protéines est déposée, dans le plus faible volume possible, sur un support inerte de nature variée, réputée neutre.

3.2.1. Electrophorèse sur papier :

Le papier a été le premier support utilisé. La longueur et la largeur de la bande sont en rapport avec les dimensions

du chevalet qui supporte le papier.

Le liquide biologique obtenu par différents moyens (par exemple, centrifugation du sang rendu ou non incoagulable) est déposé sur un repère tracé à la mine de graphite sur l'une des faces du papier. La concentration en protéines du milieu et la méthode utilisée pour l'évaluation quantitative des fractions déterminent le volume à déposer dans l'expérience. Il existe toute une variété de solutions tampons, de solutions colorantes et décolorantes, de solutions d'éluion permettant le dosage des différentes fractions séparées par le champ électrique.

Toutefois, les propriétés d'adsorption du papier vis-à-vis des protéines constituaient une gêne sérieuse pour la résolution et le dosage de ces composés : c'est pourquoi, le papier a été progressivement abandonné au profit d'autres supports.

3.2.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose :

Le faible pouvoir d'adsorption vis-à-vis des molécules protéiques, la finesse et la régularité des pores font que l'acétate de cellulose a un pouvoir résolutif très supérieur à celui du papier filtre. Mais le principe de la séparation est évidemment le même pour les deux méthodes.

Nous nous intéresserons spécialement à cette technique parce qu'elle est actuellement couramment employée en biochimie clinique : elle est utilisée en particulier, pour la séparation des hémoglobines, des fractions protéiques du sérum, des lipoprotéines, des isoenzymes des lacticodéshydrogénases. La description du matériel et du mode opératoire sera faite au paragraphe 4.

3.2.3. Electrophorèse sur gel d'amidon :

L'électrophorèse en gel d'amidon ajoute à l'action du champ électrique un effet de filtration entre les grains du gel qui fait qu'à charge nette égale, les molécules les plus petites migreront le plus loin. Par ailleurs, du fait du volume du gel que l'on peut utiliser (dans les portoirs en plexiglass de taille variable), cette méthode peut avoir un intérêt préparatif comme semi-microméthode, voire comme macrométhode. Son principe a été décrit en 1955 par SMITHIES.

Elle est utilisée en biochimie clinique pour

la détermination qualitative des groupes sériques : haptoglobines (la réaction se fait en présence d'hémoglobine et d'un réactif d'oxydo-réduction qui donne une coloration permettant le repérage des bandes), transferrines (la méthode fait appel à l'utilisation de fer radioactif).

3.2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

Sa théorie élaborée, en 1964, par ORNSTEIN a été appliquée, la même année, par DAVIS.

La phase préliminaire consiste dans la préparation du gel qui est obtenu par polymérisation de l'acrylamide (monomère principal) et du N',N' méthylène bisacrylamide (monomère de liaison), dans des proportions bien déterminées, en présence de N, N, N', N' tétra méthyl éthylène diamine ou TEMED (catalyseur) et de persulfate d'ammonium (oxydant). La polymérisation (gélification) a lieu à la température du laboratoire, extemporanément.

Comme précédemment, c'est la combinaison de la mobilité électrophorétique des protéines et du pouvoir filtrant du gel (que l'on peut modifier en faisant varier la concentration des monomères) qui aboutit au fractionnement des protéines sous forme de disques, avec une résolution très supérieure à celle fournie par le gel d'amidon.

Les auteurs cités ont donné une description type de l'enceinte électrophorétique employée et des accessoires nécessaires pour la réalisation de la méthode. L'appareillage comporte trois parties essentielles mobiles : un couvercle porte-électrode (cathode), un réservoir de tampon supérieur, un réservoir de tampon inférieur jouant en même temps le rôle de porte-électrode (anode). Le réservoir supérieur comporte des orifices à joints permettant la fixation des tubes de migration.

Après la migration, les gels expulsés sont soumis à l'action de solutions colorantes, puis décolorantes ; ils se conservent très longtemps dans l'eau. L'évaluation quantitative des fractions peut être faite au moyen d'un densitomètre intégrateur.

Cette technique permet d'obtenir un fractionnement très poussé du sérum. Mais elle peut être utilisée pour l'étude

des constituants de n'importe quel milieu biologique (protéines ribosomiales, récepteurs hormonaux).

3.2.5. Immuno-électrophorèse :

L'immuno-électrophorèse combine la mobilité électrophorétique, la diffusion à travers le gel d'agarose et la précipitation antigène-anticorps : c'est donc une méthode extrêmement spécifique.

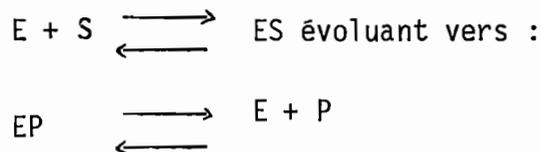
0

4 - LES LACTICODÉSHYDROGENASES

4.1. Aperçu biologique sur l'enzyme :

Parmi toutes les protéines, la classe particulière constituée par les enzymes est d'une importance indéniable pour le maintien de la vie. Beaucoup de réactions caractéristiques des tissus vivants ne pourraient se dérouler en leur absence. Un enzyme peut être défini comme un catalyseur biologique produit par le tissu vivant, qui modifie la vitesse d'une réaction sans être dégradé, ni consommé. Grâce aux enzymes, l'organisme réalise dans les conditions vitales des réactions qui nécessiteraient, *in vitro*, de grandes quantités d'énergie.

Quoique le mécanisme de l'action enzymatique soit complexe et non toujours entièrement élucidé, plusieurs théories ont été, depuis longtemps, confirmées, entre autres celle de MICHAELIS-MENTEN. La théorie de MICHAELIS-MENTEN stipule que l'enzyme forme un complexe transitoire avec son substrat. Au sein de ce complexe, les groupements fonctionnels des hétéroprotéines ou certains résidus d'acides-amino des holoprotéines joueraient un rôle déterminant. L'hypothèse de MICHAELIS-MENTEN représente la réaction enzymatique comme suit :



où E = enzyme, S = substrat, P = produits, ES = complexe enzyme-substrat.

L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de la réaction. La vitesse est déterminée en dosant, après un certain temps d'action :

- soit le substrat restant,
- soit l'un des produits de décomposition du substrat.

On rapporte le chiffre obtenu à un certain volume du liquide biologique étudié.

La vitesse dépend de la concentration en enzyme, en substrat, de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et de facteurs phy-

sico-chimiques divers : pH, force ionique du milieu, température.

La définition précise de tous ces facteurs est indispensable pour obtenir une expression reproductible de l'unité de mesure de l'activité enzymatique.

Par souci d'uniformité, les résultats peuvent être exprimés en micromoles de substrat décomposé (ou de produit formé) par minute.

Mais on ne doit pas oublier que cette recommandation de la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie (UIB) reste sous la dépendance de la technique utilisée.

Face à la variété des méthodes, la tendance actuelle est en faveur de l'énoncé des résultats d'un essai enzymatique en unités internationales.

Une unité internationale (U.I.) est la quantité d'enzyme capable de transformer, à 30°C, une micromole de substrat en une minute, toutes les autres conditions de la réaction étant optimales.

L'activité du sérum est évaluée en milliunités par millilitre (mU/ml) ou unités par litre (U/l).

L'enzymologie clinique est très pratiquée aujourd'hui dans le diagnostic biologique de plusieurs atteintes organiques. Les lactico-déshydrogénases, tout comme les phosphatases, les transaminases glutamique-oxalo-acétique et glutamique-pyruvique, l'amylase, la lipase occupent une place de choix dans les analyses enzymologiques de routine en milieu hospitalier.

En ce qui concerne les lactico-déshydrogénases, une élévation significative de la concentration sérique au-dessus de la normale peut témoigner de l'atteinte de divers organes : muscle squelettique, foie, coeur, reins, poumons, pancréas, érythrocytes etc. Tous ces tissus contiennent l'enzyme, mais en proportions variables.

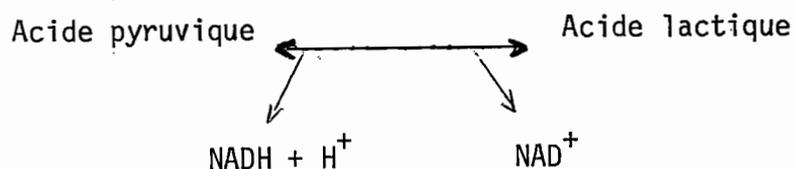
La présence de lactate-déshydrogénase (LDH) sérique a été rapportée pour la première fois par HILL et LEVI en 1954. Des études ultérieures ont révélé qu'une activité élevée de la lactate-déshydrogénase est associée à de nombreux cas pathologiques.

Le sérum humain normal contient une petite quantité de lactico-déshydrogénase circulante provenant de l'altération physiologique normale des tissus de l'organisme. Lors d'une souffrance tissulaire des organes cités précédemment, la concentration d'enzyme s'accroît jusqu'à atteindre un taux sérique notable : cette augmen-

tation significative n'est autre que la conséquence biologique de la lésion des tissus.

La lactate-déshydrogénase sérique (LDH) atteint 2 à 10 fois sa valeur normale tout de suite après l'infarctus du myocarde ; un pic est atteint dans les 48 à 72 heures, il revient progressivement à la normale dans l'espace d'une ou deux semaines (WACKER et Coll. 1956, Mc DONALD et Coll. 1957). L'activité LDH est augmentée au cours de la cirrhose, de l'hépatite et des métastases hépatiques (HILL et LEVI 1954 ; HIEH et BLUMENTHAL 1956 ; WROBLEWSKI 1959). Des valeurs élevées se rencontrent généralement dans le cas d'embole pulmonaire, d'anémie mégaloblastique, de dystrophie musculaire progressive et d'affections rénales (THIERS et WALLEE 1958 ; WEST et Coll. 1958 ; WACKER et SNODGRASS 1960 ; WACKER et Coll. 1961 ; WACKER et DORFMAN 1962 ; DORFMAN et Coll. 1963). Etant donné la multiplicité des organes dont on peut suspecter la lésion devant une LDH totale élevée, il faudra avoir recours à l'identification et si possible au dosage des isoenzymes de la LDH pour reconnaître le ou les organes endommagés.

La LDH est un enzyme qui catalyse la réaction réversible :



Indistinctement, tous les isoenzymes de la LDH catalysent cette réaction. On observe toutefois une différence entre les isoenzymes concernant l'affinité pour le substrat qui peut être autre que l'acide pyruvique ou l'acide lactique (acide α -hydroxybutyrique pour l'isomère 1).

Il est logique de procéder d'abord au dosage de la LDH totale. Il existe plusieurs méthodes de dosage : actuellement on pratique couramment la mesure de la consommation de la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD codéshydrogénase) par observation de la diminution de la densité optique à 340 nm : c'est la technique de WROBLEWSKI.

La deuxième étape consiste à rechercher la distribution des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase. Ces isoenzymes, très voisins sur le plan de leur action catalytique, présentent des variations structurales concernant la nature des sous-unités qui les constituent.

LATNER (1967), dans une revue récente a réuni les connaissances actuelles sur les isoenzymes.

Les isodéshydrogénases lactiques humaines sont au nombre de cinq selon leurs structures quaternaires. On réalise leur séparation sur gel d'amidon, sur agarose, sur acétate de cellulose, ce dernier support étant le plus utilisé.

Dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique croissante vers l'anode, à pH 8,6, les isodéshydrogénases lactiques du sérum humain ont été numérotées de 1 à 5.

Les bandes majoritaires des différents tissus sont :

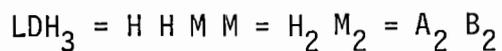
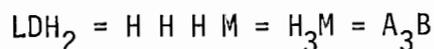
- coeur, globules rouges, reins, cerveau :
- LDH₁, LDH₂ ;
- poumons, pancréas, glandes surrénales : LDH₃ ;
 - rate, thymus, thyroïde, globules blancs :
- LDH₄, LDH₅ ;
- muscle, foie : LDH₅.

Cette répartition a été donnée par PRESTON et Coll. en 1965.

Les cinq isolactico-déshydrogénases sériques sont des tétramères résultant de la combinaison, en proportions variables, de deux peptides de structures différentes. Ces peptides ont été dénommés H (heart) et M (muscle) par les auteurs anglosaxons, tandis que les francophones utilisent plutôt les termes A et B respectivement pour les désigner.

Le peptide H (A) possède plus de charges négatives que M (B).

Les mobilités anodiques des isoenzymes lactiques sont en rapport avec leur teneur en peptide H (A). Cette teneur correspond aux combinaisons suivantes :



MARKET, en 1963, a établi la preuve de ces structures.

L'aptitude des organes à synthétiser les peptides H et M est variable. Ainsi, suivant l'organe envisagé, les divers isoenzymes ont une distribution différente. Les diagrammes sont reproduits sur la figure 1, tandis que l'activité LDH totale par organe fait l'objet de la figure 2. Ces figures ont été extraites de SCHMIDT et SCHMIDT : "Guide to Practical Enzyme Diagnosis" (cf. bibliographie).

Parmi les essais de quantification des isoenzymes du sérum humain normal, on peut citer ceux de PRESTON et Coll. (1965) :

LDH_1 : 30 - 90 mU/ml

LDH_2 : 35 - 100 mU/ml

LDH_3 : 20 - 50 mU/ml

LDH_4 : 0 - 20 mU/ml

LDH_5 : 0 - 25 mU/ml.

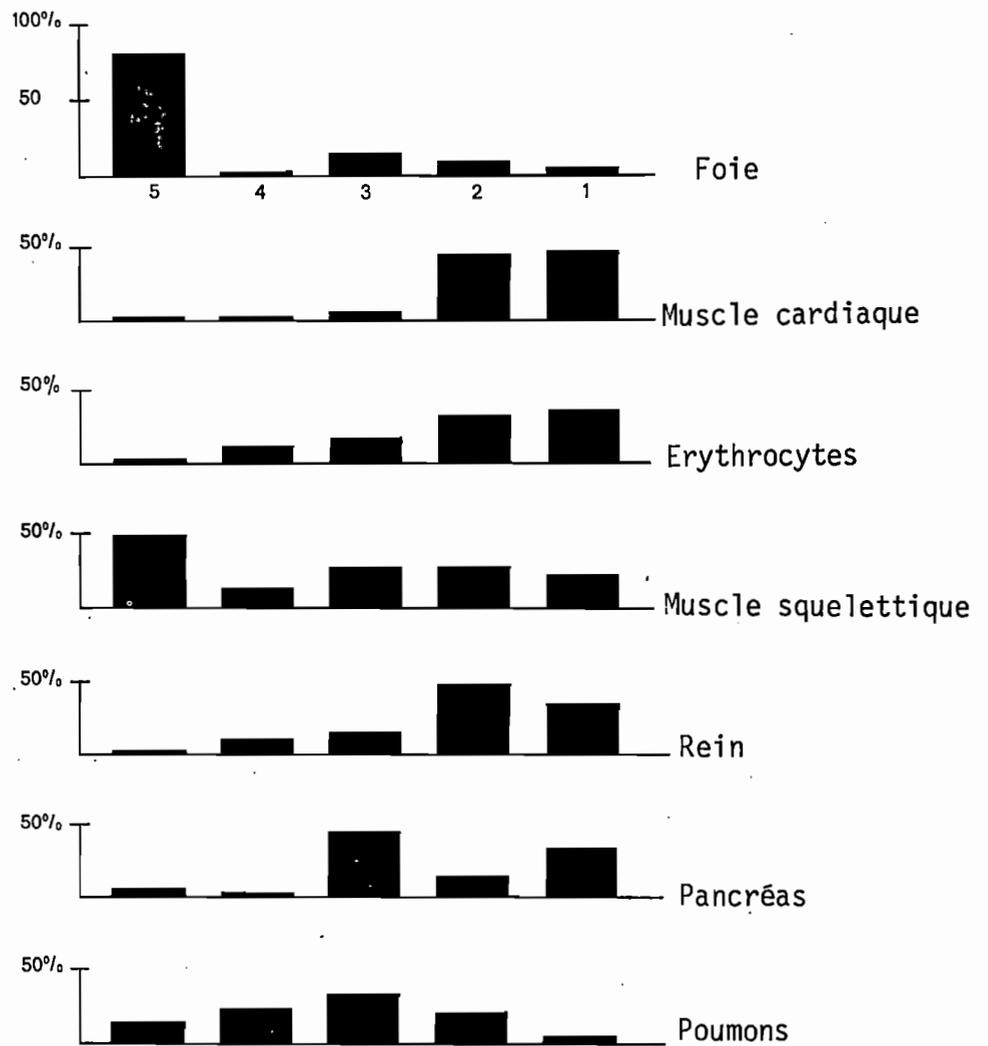
Certains auteurs préfèrent l'expression des résultats en pourcentages de l'activité LDH totale : d'après WIEME (cité par POLONOVSKI et Coll. 1971) les pourcentages obtenus après électrophorèse du sérum en gel d'agarose seraient :

Fraction	Adulte	Enfant
LDH_1	22	29
LDH_2	39	41
LDH_3	19	24
LDH_4	11	4
LDH_5	8	2

TABLEAU 1

Fig. 1 : Distribution des iso-enzymes de la LDH. Principes de détermination :

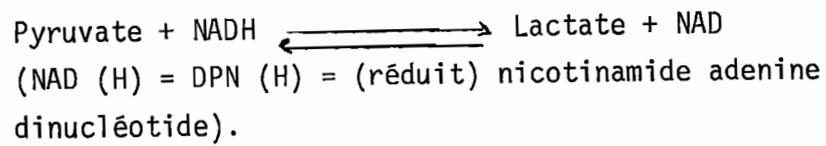
Séparation par chromatographie sur DEAE-cellulose ou DEAE-Séphadex ; séparation électrophorétique sur papier, amidon, gel d'agar ou feuille de cellulose.



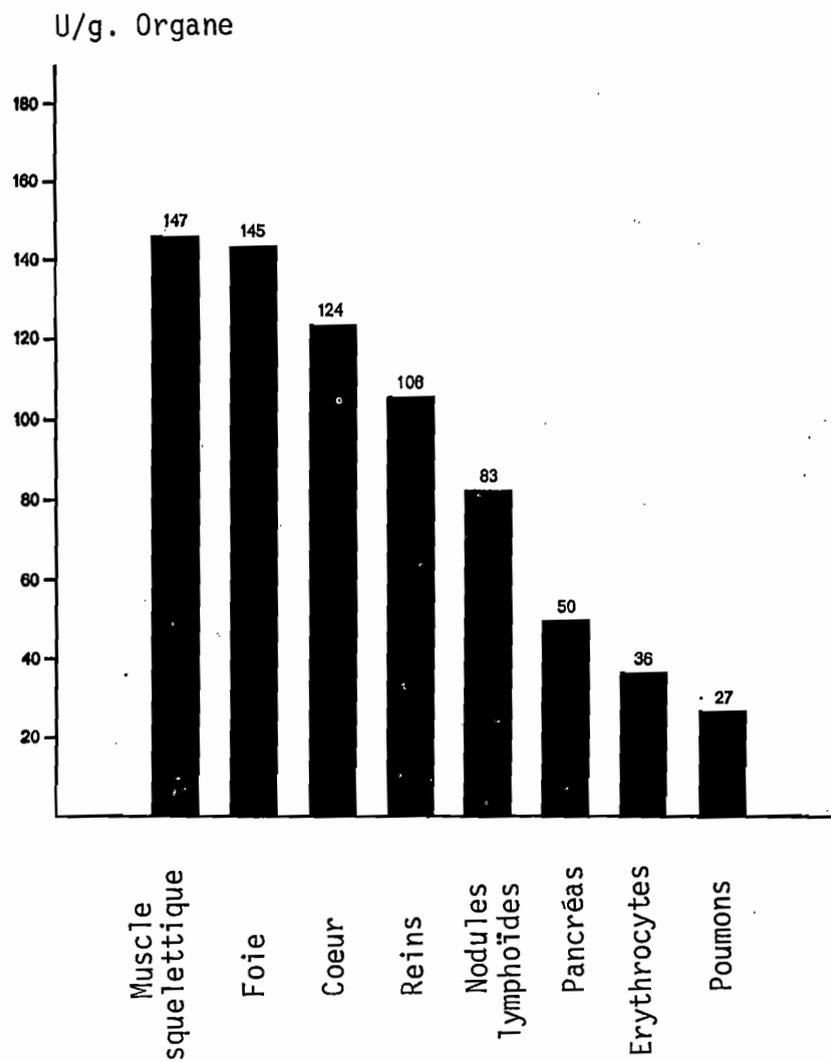
D'après WROBLEWSKI F., Progr. Cardiovasc. Dis. 6, 63 (1963)
 WIELAND Th. und E.D. WACHSMUTH, Biochem. Z. 334, 185 (1961).

Fig. 2 : LDH = Lactate déshydrogénase

Réaction catalysée :



ACTIVITE LDH DANS LES ORGANES HUMAINS



Qualitativement, les cinq isoenzymes existent dans tous les organes, mais leurs proportions y sont très différentes ; c'est pourquoi la séparation des isoenzymes de la LDH présents dans le sérum sert à mesurer le degré de souffrance de divers organes, en particulier le coeur, le poumon, et le foie.

Le tableau 2 résume, de façon qualitative, les variations observées dans diverses maladies cardio-vasculaires, hépatobiliaires, sanguines et autres.

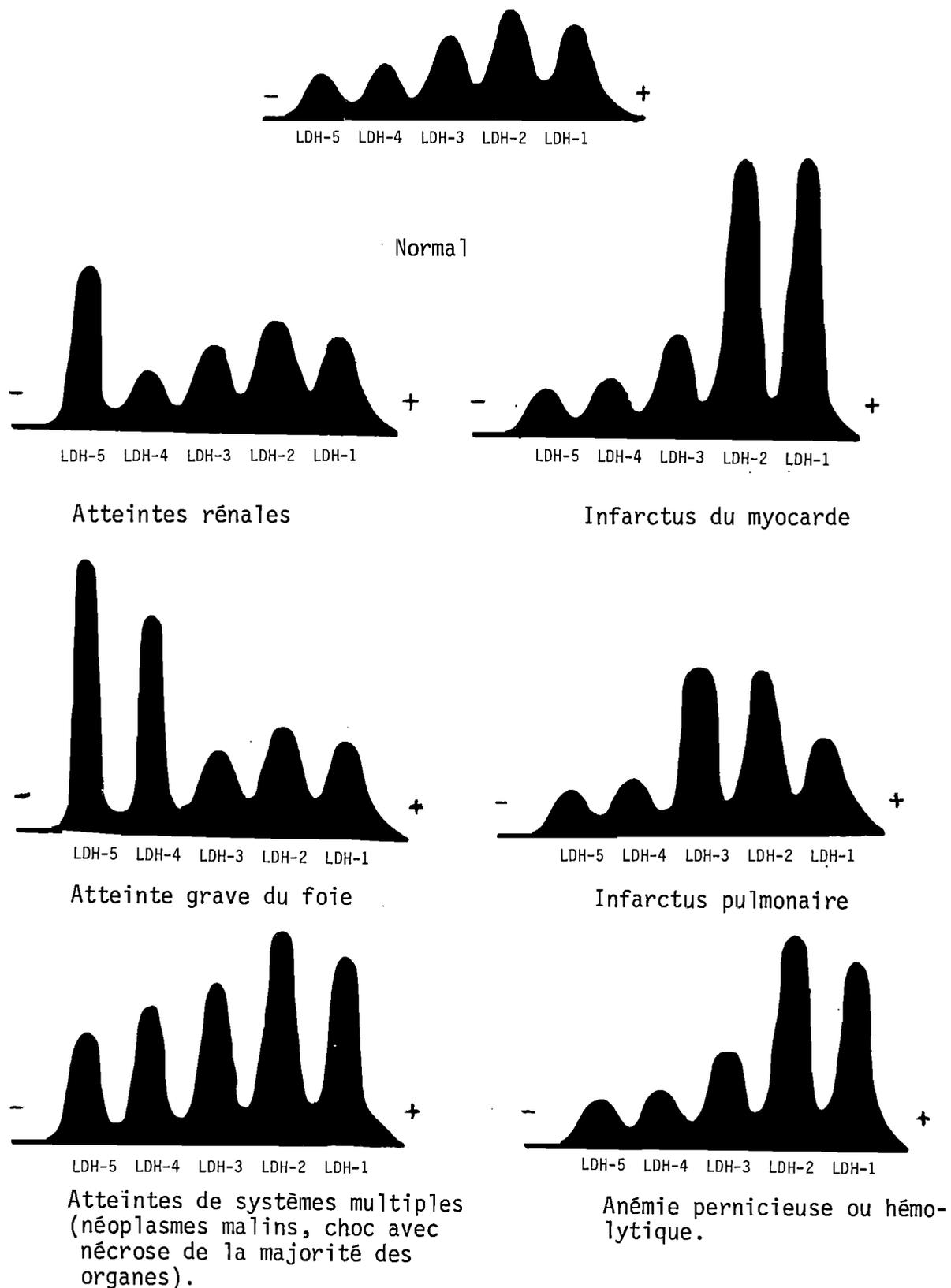
La figure 3 montre les profils des diagrammes, obtenus par densitométrie, dans les atteintes du coeur, du poumon, du foie, du rein, des érythrocytes, et dans une atteinte multiple que l'on peut comparer avec l'image donnée par le sérum normal : à la suite d'un infarctus du myocarde, l'augmentation de la fraction 1 est significative, au point qu'elle dépasse la fraction 2, laquelle n'accuse qu'une élévation modérée ; quant à la fraction 5, elle s'élève franchement en cas d'atteinte du tissu hépatique ; enfin, si la fraction 3 augmente considérablement, ainsi que la fraction 2, il s'agit d'une atteinte pulmonaire.

ATTEINTES	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
Cardio-vasculaires					
Infarctus du myocarde	+	+			
Infarctus pulmonaire		+	+		
Rhumatisme cardiaque	+	+			
Fièvre rhumatoïde					
Myocardite	+	+			
Etat de choc	+	+	+	+	+
Péricardite					
Embolie pulmonaire					
Hépto-biliaires					
Hépatite					+
Cirrhose active					+
Cirrhose inactive					
Congestion hépatique					+
Sanguines					
Anémie pernicieuse	+	+	+	+	+
Anémie hémolytique	+	+	+	+	+
Anémie mégaloblastique	+	+	+		
Lymphome ou leucémies avec hémolyse	+	+	+		
Anémie sans hémolyse					
Autres					
Mononucléoses infectieuses			+	+	+
Adénocarcinome du côlon	+	+	+	+	+
Nécrose tubulaire et rénale	+	+	+	+	+
Nécrose du muscle					+
Néoplasmes malins divers					

TABLEAU 2

VARIATIONS QUALITATIVES OBSERVEES DANS DIVERSES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES, HEPATO-BILIAIRES, SANGUINES ET AUTRES AU NIVEAU DES ISOENZYMES DE LA LDH. (Les cases vides correspondent à un taux normal d'isoenzyme, d'après PRESTON et Coll. 1965).

Fig. 3 : Comparaison de l'électrophorégramme d'un sérum normal aux profils dans le cas de diverses atteintes pathologiques.



Dans la partie expérimentale de notre travail, nous nous proposons de déterminer des valeurs moyennes de chacun des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase dans le sérum humain, après électrophorèse sur acétate de cellulose et à partir d'un échantillonnage statistiquement valable.

4.2. Matériels :

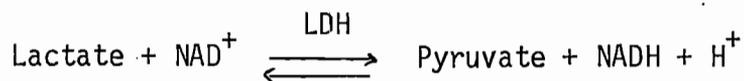
4.2.1. Choix des sérums :

Des sérums provenant des différents services de l'Hôpital Nord de Marseille ont été sélectionnés pour notre étude selon trois critères.

- Valeur totale de la LDH sérique inférieure à la valeur normale limite de 90 UI/l.

La méthode de dosage de la LDH totale que nous avons utilisée suit le principe de WACKER et Coll. (1956).

La réaction catalysée par la LDH est réversible et la valeur de l'activité enzymatique peut être mesurée dans les deux sens. La méthode de WACKER et Coll. (1956) améliorée par AMADOR et Coll. (1963) utilisant la transformation lactate → pyruvate, constitue une méthode de choix à cause de la plus grande linéarité de la réaction. En outre, une longue période d'incubation n'est pas requise pour la consommation des autres substrats sériques de l'enzyme (AMADOR et Coll. 1963).



La lactate-déshydrogénase catalyse la conversion du lactate en pyruvate et du NAD^+ en NADH. L'activité LDH est directement proportionnelle à l'augmentation de la densité optique du NADH à 340 nm.

L'hémolyse dans les échantillons doit être à tout prix évitée, car les globules rouges contiennent approximativement 100 fois la concentration normale de la LDH sérique.

Les échantillons traités à l'oxalate, au citrate ou à l'héparine ne doivent pas être utilisés, puisqu'il est connu que ces substances modifient les résultats du test.

Le taux de LDH reste stable pendant 8 heures à

25°C ou pendant une semaine à 2-6°C. Le sérum ne doit pas être congelé, car il a été rapporté que les isoenzymes de la LDH peuvent être de ce fait inactivés.

CONDITION DE LA REACTION : (méthode manuelle).

Durée de la réaction	2 à 5 mn
Longueur d'onde	340 nm (parfois 366 ou 344 nm)
Volume de l'échantillon	0,1 ml
Volume du réactif*	3,0 ml
Volume réactionnel	3,1 ml
Température de la réaction	25, 30 ou 37°C

Il s'agit d'un dosage cinétique : les mesures sont faites entre 30 s et 5 mn après l'addition du sérum.

* COMPOSANTS DU REACTIF :

NAD	: 4,95 $\mu\text{mol/ml}$ (dans le réactif reconstitué)
	: 4,79 $\mu\text{mol/l}$ (en concentration finale dans le mélange réactionnel)
Lactate de lithium	: 59,5 $\mu\text{mol/ml}$ (dans le réactif reconstitué)
	57,77 $\mu\text{mol/l}$ (en concentration finale)
Tampon-Tris pH 8,8	: 106,0 $\mu\text{mol/ml}$ (réactif reconstitué)
	103 $\mu\text{mol/l}$ (mélange réactionnel)

Il est recommandé d'utiliser d'une manière routinière un sérum normal et un sérum anormal pour les contrôles de qualité (sérums dont les teneurs en LDH ont été établies une fois pour toutes par la même technique de dosage).

Les résultats sont exprimés en unités internationales par litre (UI/l). Une unité internationale correspond à la réduction d'une micromole de NAD par minute à 30°C.

Nombre d'unités internationales par litre de sérum :

$$\frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times 1.000 \times T_f \times 3,1 \times 10^3}{6,22 \times 10^3 \times \text{ml de sérum utilisé} \times \text{LP}}$$

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: augmentation de la densité optique par minute.

- 1.000 : conversion des millilitres en litres,
 Tf : facteur de conversion de la température.
 3,1 : volume réactionnel total.
 10^3 : conversion de micromoles en millimoles.
 $6,22 \times 10^3$: coefficient d'extinction molaire de NADH à 340 nm
 ($3,3 \times 10^3$ à 366 nm ; $6,0 \times 10^3$ à 344 nm).
 LP : trajet optique en centimètres.

Cette méthode mesure l'activité lactate-déshydrogénase totale sérique sans considération du tissu ou de l'organe d'origine. La valeur normale limite de la LDH sérique, déterminée par cette méthode, est de 90 UI/l.

- Aspect physique normal du sérum : les sérums lactescents ou fortement colorés ont été éliminés.

- Aspect normal de l'électrophorégramme.

Quelques sérums remplissant les deux conditions précédentes ont montré une répartition anormale des isoenzymes de la LDH : fractions 4 et 5 absentes, fraction 1 plus élevée que la fraction 2, par exemple. Les résultats obtenus avec ces sérums n'ont pas été pris en considération.

4.2.2. Conditions d'électrophorèse :

Le matériel utilisé est le dispositif "SEBIA" (SEBIA, 23, rue Maximilien Robespierre 92130 - Issy-les-Moulineaux).

L'échantillon à analyser est déposé sur une feuille d'acétate de cellulose (5,7 x 14 cm) au moyen d'un applicateur mécanique approprié. Quatre sérums différents peuvent être déposés simultanément sur la même feuille, mais les faibles colorations développées par la méthode exigent l'accumulation de 10 dépôts successifs du même échantillon. La séparation des isodéshydrogénases lactiques s'effectue en 60 minutes, sous 250 volts, dans un tampon Tris-Véronal pH 8,6, de force ionique 0,05.

4.2.3. Coloration :

Le colorant proposé par "SEBIA" est conditionné sous forme de gélules que l'on reconstitue extemporanément dans 1 ml d'eau distillée. La bande d'acétate de cellulose est retirée de la

cuve d'électrophorèse et, immédiatement, sa surface imprégnée par le réactif. On laisse la coloration bleue se développer en 10 mn environ, à l'obscurité, de façon à éviter le bleuissement du fond de la bande.

Le processus est arrêté par immersion dans le mélange eau/formaldéhyde/glycérol (90 : 10 : 10).

4.2.4. Densitométrie :

L'évaluation du pourcentage de chaque isoenzyme est faite automatiquement par le densitomètre "SEBIA Supercellomatic". L'appareil délivre un profil de l'absorbance de l'électrophorégramme, imprimé sur papier thermosensible, en même temps que le pourcentage relatif de chaque fraction par rapport à l'absorbance totale de la bande (fig. 4).

Le densitomètre fournit, par ailleurs, les mêmes informations en ce qui concerne les protéines plasmatiques, l'hémoglobine, les lipoprotéines.

4.3. Méthodes :

4.3.1. Quarante trois sérums ont satisfait aux exigences définies au paragraphe 4.2.1. :

Nous avons donc obtenu 43 profils électrophorétiques et les valeurs des fractions LDH_1 , LDH_2 , LDH_3 et LDH_{4+5} correspondantes (les fractions 4 et 5 n'étant pas toujours bien séparées, nous avons préféré les regrouper systématiquement).

L'ensemble des résultats numériques a été présenté sous forme d'histogrammes (fig. 5a et 5b) puis les valeurs moyennes (\bar{x}) de chaque fraction et les paramètres statistiques (écart type σ et coefficient de variation $cv = \frac{\sigma}{\bar{x}}$) calculés (tableau 4).

La valeur de l'activité lactico-déshydrogénasique totale de chaque sérum étant connue, nous avons calculé, pour l'ensemble des 43 sérums, les valeurs \bar{x} , σ , et cv , caractéristiques des LDH totales :

\bar{x} : 67 UI/l
 σ : 14 UI/l
 cv : 21 %.

LDH ₁	17,5 %
LDH ₂	36,9 %
LDH ₃	32,6 %
LDH ₄₊₅	13,1 %

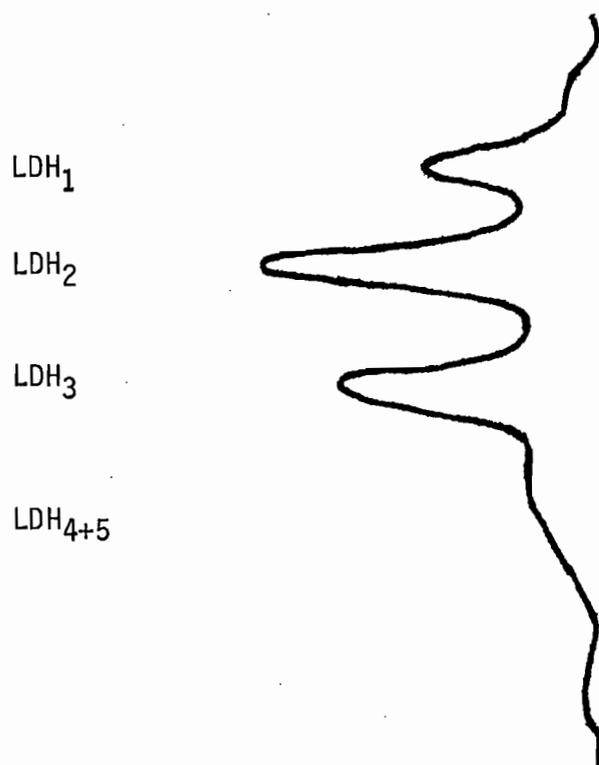
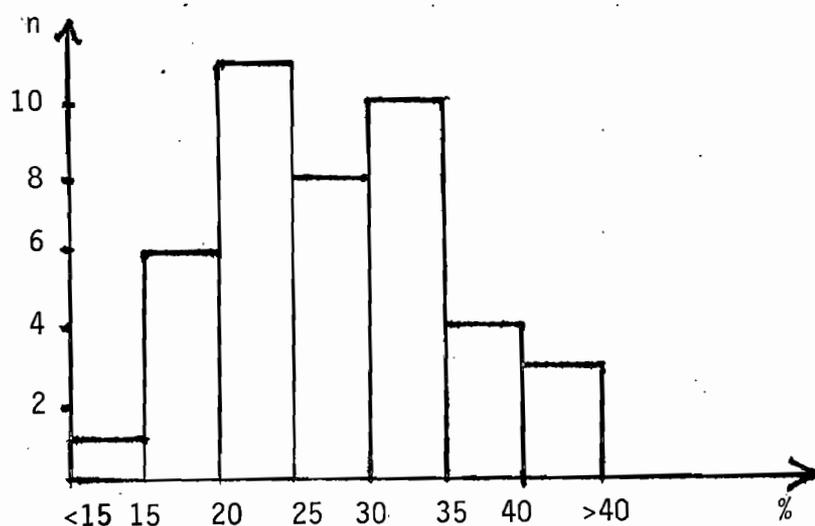
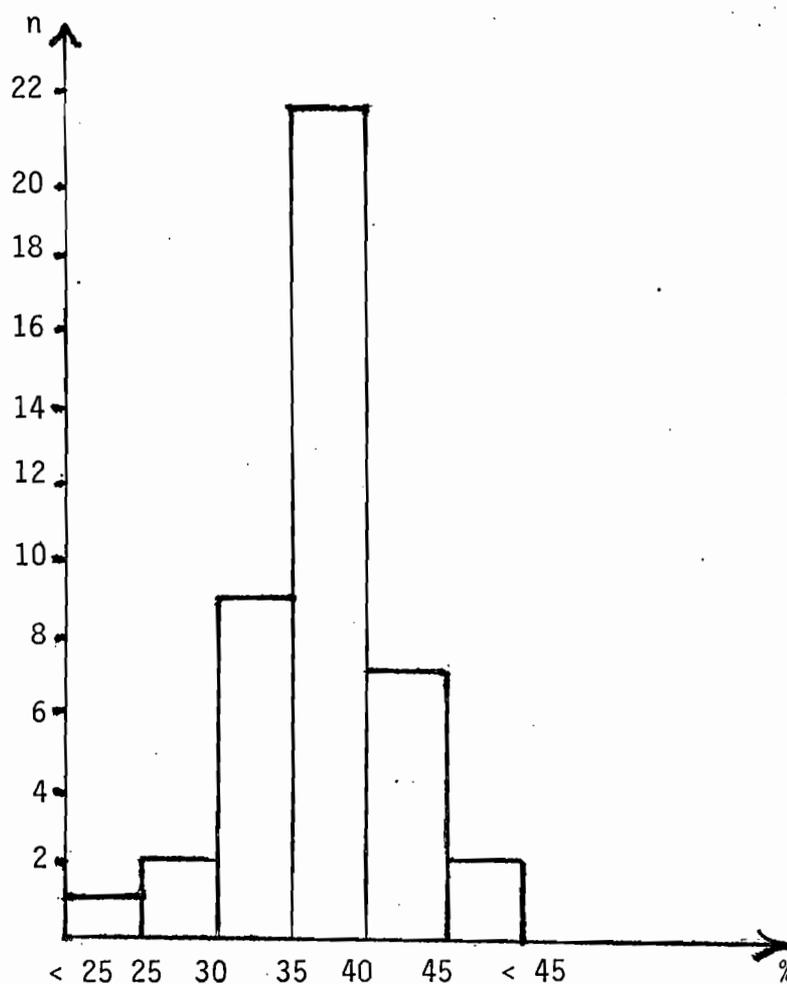


Fig. 4 : Profil de l'absorbance de l'électrophorégramme, délivré par le densitomètre "SEBIA" supercellomatic", en même temps que le pourcentage relatif de chaque fraction.

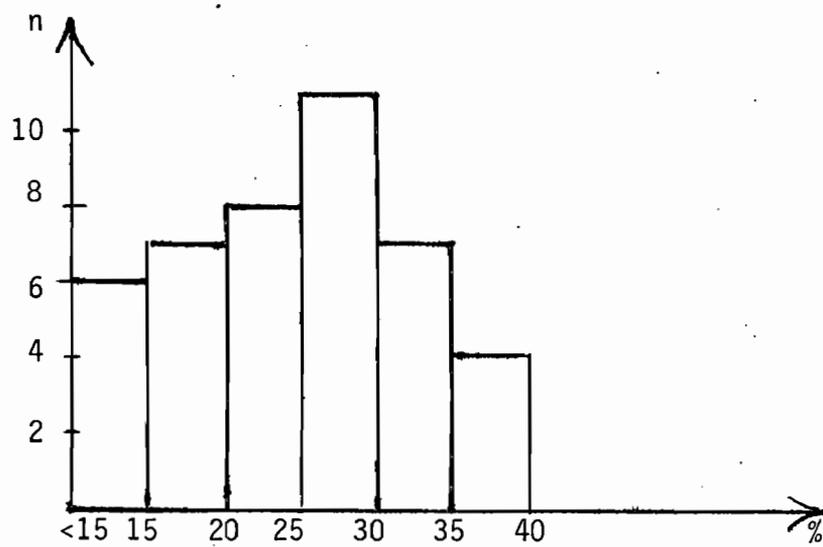


HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA FRACTION LDH₁

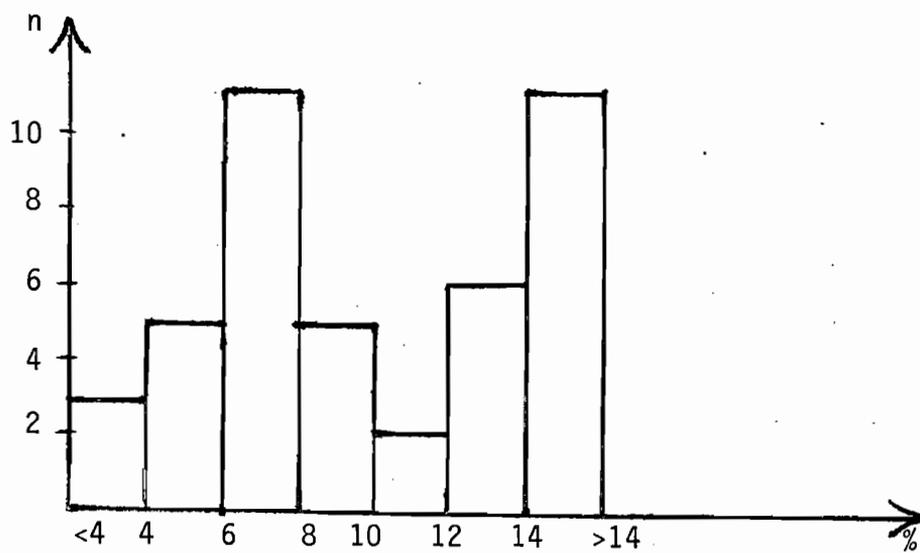


HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA FRACTION LDH₂

Figure 5a



HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA FRACTION LDH₃



HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA FRACTION LDH₄ + LDH₅

Figure 5b

4.3.2. Afin de mieux interpréter les résultats, nous avons procédé à la détermination des caractères statistiques de la distribution des fractions Albumine, α_1 -, β -, et γ -globulines sériques. Pour cela, 23 électrophorégrammes des protéines sériques, obtenus au laboratoire de Chimie Biologique du Centre Hospitalo-Universitaire Nord de Marseille et présentant un aspect normal, ont été sélectionnés, et les paramètres \bar{x} , σ et cv déterminés pour les quatre fractions précitées (tableau 6).

4.3.3. Enfin, pour mesurer l'influence des variations dues aux conditions de dépôt, de migration et de densitométrie, nous avons effectué les deux expériences suivantes :

- les isoenzymes d'un sérum quelconque ont été séparés et colorés, puis la bande a été lue 8 fois consécutivement. Les résultats obtenus (tableau 4) témoignent de la reproductibilité de la mesure densitométrique ;

- plusieurs parties aliquotes du même sérum ont été traitées dans les mêmes conditions : on a ainsi obtenu 8 profils distincts ; les paramètres \bar{x} , σ et cv ont été calculés pour chaque fraction : ils permettent d'apprécier la reproductibilité des opérations de dépôt et de coloration (tableau 5).

4.4. Résultats et discussion :

L'ensemble des valeurs numériques correspondant aux 43 sérums choisis a été regroupé sous la forme des histogrammes de la figure 5. Ces histogrammes montrent une distribution statistique normale, de type gaussien, pour les fractions 2 et 3, une distribution plus complexe pour les autres fractions.

Le tableau 3 indique les valeurs moyennes calculées à partir de l'ensemble des résultats chiffrés obtenus. Nous avons retrouvé, expérimentalement, l'ordre d'importance connu des isoenzymes sériques de la LDH à savoir :

$$LDH_2 > LDH_1 > LDH_3 > LDH_{4+5}$$

Lorsque nos propres valeurs sont comparées à celles obtenues par électrophorèse sur gel d'agarose par WIEME, l'accord est bon, la seule différence pouvant se situer au niveau des frac-

Fraction	1	2	3	4 + 5
Valeur moyenne \bar{x}	27,6	37,1	24,9	10,0
Ecart type σ	7,6	4,6	7,5	4,4
Coefficient de variation cv	27,5	12,4	30,1	44

TABLEAU 3 : FRACTIONNEMENT DES ISOENZYMES DE LA LDH : CARACTERES STATISTIQUES DES VALEURS DE CHAQUE FRACTION EN POURCENTAGE (ETUDE DE 43 SERUMS).

Fraction	1	2	3	4 + 5
\bar{x}	37,7	42,5	6,20	11,6
σ	2,6	2,7	0,46	2,6
cv	6,9 %	6,3 %	7,4 %	22,0 %

TABLEAU 4 : REPRODUCTIBILITE DE LA MESURE DES ISOENZYMES DE LA LDH. CARACTERES STATISTIQUES DE LA LECTURE DENSITOMETRIQUE REPETEE (8 FOIS) D'UN MEME ELECTROPHOREGRAMME.

tions 4 et 5, beaucoup moins représentées dans notre étude que dans celle de WIEME.

Nous avons cependant noté que ces valeurs moyennes, en accord avec celles de la littérature, avaient été obtenues à partir de valeurs individuelles relativement dispersées comme en témoignent les valeurs des coefficients de variations calculées pour chaque fraction (tableau 3). Nous avons tenté de comprendre l'origine d'une telle dispersion et nous avons retenu deux hypothèses simples : soit cette dispersion témoigne d'une hétérogénéité réelle dans la distribution des isoenzymes de la LDH sérique, soit elle est créée artificiellement par un manque de reproductibilité dans la méthode utilisée.

Afin de tester la première hypothèse, nous avons cherché à mesurer la dispersion dans la répartition des fractions protéiques totales du sérum humain, séparées par une méthode d'électrophorèse tout à fait semblable à celle utilisée pour la séparation des isodéshydrogénases lactiques. Pour cela, nous avons sélectionné, parmi une cinquantaine d'électrophorèses de protéines sériques, 23 d'entre elles présentant un aspect normal et effectué les mesures de \bar{x} , σ et cv pour les fractions albumine, α_1 , β - et γ -globulines. Les résultats, consignés dans le tableau 6, montrent que les coefficients de variations observés ont une valeur approximativement deux fois plus faible que pour les fractions LDH sériques. Ce résultat pourrait apporter un certain crédit à l'hypothèse testée, c'est-à-dire que la répartition des valeurs des isoenzymes de la LDH semble varier d'individu à individu d'une façon nettement plus importante que l'ensemble des protéines du sérum. Nous avons cependant voulu déterminer avec plus de rigueur l'influence des conditions expérimentales sur la dispersion des résultats.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la reproductibilité des conditions d'électrophorèse (dépôt, migration, coloration). Le même sérum a été séparé et coloré 8 fois, puis chaque électrophorégramme a été quantifié. Les résultats obtenus (tableau 5) montrent une variabilité non négligeable dans l'analyse d'un même échantillon, plus importante que celle donnée par le protidogramme (tableau 7) : ce facteur doit entrer pour une part non négligeable dans la dispersion de nos résultats. Par contre, lorsqu'un même fractionnement est lu à plusieurs reprises, les valeurs obtenues (tableau 4) sont, nous semble-t-il, d'une assez bonne reproductibilité, très voisine de celle montrée par le protidogramme (tableau 8), exception faite de la fraction LDH_{4+5} (la très faible densité optique associée à cette fraction peut être considérée comme la cause majeure de l'indétermination liée à sa quantification).

Fraction	1	2	3	4 + 5
\bar{x}	23,1	38,6	22,3	15,2
σ	1,9	4,8	1,52	0,8
cv	12,2	8	14,6	19,1

TABEAU 5 : REPETABILITE DU DEPOT ET DE LA COLORATION DES ISOENZYMES DE LA LDH D'UN MEME SERUM. CARACTERES STATISTIQUES D'UN FRACTIONNEMENT REPETE 8 FOIS.

Fraction	Alb.	α_1G	βG	γG
\bar{x}	57,73	3,52	12,36	17,36
σ	3,80	0,81	1,66	3,28
cv	6,6	23	13	19

TABEAU 6 : CARACTERES STATISTIQUES DU FRACTIONNEMENT ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SERIQUES EN POURCENTAGE (ETUDE DE 23 ELECTROPHOREGRAMMES D'ASPECT NORMAL).

Fraction	Alb.	α_1G	βG	γG
\bar{x}	64,8	3,1	10,2	12,5
σ	0,40	0,23	0,94	0,62
cv	0,6 %	7,5 %	9,2 %	5 %

TABEAU 7 : REPRODUCTIBILITE DU DEPOT ET DE LA COLORATION. FRACTIONS DES PROTEINES PLASMATIQUES TOTALES D'UN MEME SERUM. CARACTERES STATISTIQUES D'UN FRACTIONNEMENT REPETE 8 FOIS.

Fraction	Alb.	α_1G	βG	γG
\bar{x}	62,2	3,6	11,9	12,9
σ	0,41	0,35	0,97	1,13
cv	0,6 %	9,7 %	8,1 %	8,8 %

TABEAU 8 : REPETABILITE DE LA MESURE DES FRACTIONS DES PROTEINES PLASMATIQUES TOTALES. CARACTERES STATISTIQUES DE LA LECTURE DENSITOMETRIQUE REPETEE (8 FOIS) D'UN MEME ELECTROPHOREGRAMME.

En résumé, les valeurs moyennes établies dans notre travail sont tout à fait comparables à celles trouvées par d'autres auteurs, mais une grande hétérogénéité des valeurs individuelles a été notée. L'origine de cette variabilité peut être attribuée, en première analyse, à deux causes :

- une réelle dispersion de valeurs individuelles des isoenzymes de la LDH. Notre étude n'ayant pu porter sur un grand nombre d'échantillons, il est possible que les causes simples de variabilité (âge, sexe du sujet) qui n'ont pu être examinées, expliquent ce phénomène. On ne peut exclure, cependant, l'idée d'une variabilité intrinsèque importante des isoenzymes, leur taux dans le sérum étant régi par de multiples paramètres : biosynthèse dans les organes, lyse cellulaire, dégradation par les protéases sériques...

- un manque de reproductibilité dans l'analyse elle-même ; ce défaut semble être inhérent à la méthode utilisée et peut être attribué essentiellement à des problèmes de coloration des fractions. En effet, la réaction colorée utilisée met en jeu l'activité catalytique des LDH dans des conditions peu contrôlables : le substrat est étalé à la surface de la bande et doit pénétrer dans l'épaisseur du support d'acétate de cellulose pour y réagir avec l'enzyme. Des variations de l'accessibilité des LDH au réactif, de bande à bande, ou même à l'intérieur d'une même bande sont donc possibles, même probables.

Nous pensons que c'est l'ensemble de ces facteurs qui peut expliquer la dispersion importante des valeurs individuelles des isodéshydrogénases lactiques que nous avons observée dans notre étude.

5 - CONCLUSION GENERALE

Nous avons essayé de rapporter dans ce mémoire un travail présentant à la fois un caractère général, sur les différents aspects de l'électrophorèse et une facette expérimentale et pratique sur la séparation des isoenzymes de la lacticodéshydrogénase.

Le pouvoir de résolution des méthodes d'électrophorèse n'est plus à démontrer. L'utilisation de différents supports (papier, acétate de cellulose, gel de polyacrylamide, pour ne citer que ceux-là) a permis de résoudre élégamment le problème de la séparation des composés chargés électriquement (acides aminés, peptides, protéines) soit à des fins de recherche, soit pour la biochimie clinique. Parallèlement, s'est développée la conception de densitomètres capables de mesurer automatiquement l'absorbance des fractions séparées et colorées et de calculer très rapidement les pourcentages relatifs de chacune d'elles. L'électrophorégramme est ainsi quantifié.

Toutefois ces résultats numériques, délivrés d'une façon automatique par un appareillage sophistiqué, doivent parfois être considérés avec circonspection. La reproductibilité dans les mesures du densitomètre intégrateur n'est pas en cause (cf. tableau 4), mais des interférences possibles peuvent rendre sans signification un résultat numérique. C'est ainsi qu'au cours de notre étude, nous avons remarqué que le fractionnement des LDH d'un sérum très jaune (ictérique) peut conduire à des résultats totalement erronés : en effet, l'albumine migrant un peu plus loin vers l'anode que la fraction LDH_1 , l'absorbance de l'albumine fortement colorée en jaune par la bilirubine, va venir s'ajouter à celle de la LDH_1 . Dans ce cas l'aspect à l'oeil nu de l'électrophorégramme est normal, mais les résultats numériques montrent une augmentation artificielle du pourcentage de la LDH_1 , pouvant laisser croire à une atteinte du myocarde. Ce fait, joint à la grande dispersion des valeurs individuelles des isoenzymes de la LDH ainsi qu'au manque de reproductibilité de la méthode de séparation-coloration, nous permet de suggérer que la quantification de l'électrophorégramme de ces isoenzymes peut présenter certains dangers. Nous préconisons donc une interprétation au simple vu du profil

d'absorbance de l'électrophorégramme. Les altérations de ce profil, associées aux nécroses les plus courantes sont en effet assez caractéristiques pour pouvoir fournir une interprétation clinique sans ambiguïté.

B I B L I O G R A P H I E

(Les références précédées d'une astérisque sont citées dans le texte).

A. OUVRAGES GENERAUX

- ABRAMSON H.A., MOYER L.S. et GORIN M.H. :
Electrophoresis of proteins and chemistry of cell surfaces.
New-York, Reinhold Publ. Corp., 1942.
- AUDUBERT R. :
Propriétés électro-chimiques des systèmes dispersés, colloï-
des et suspensions.
Paris, Gauthier-Villars, 1944.
- AUDUBERT R., DE MENDE S. :
Les principes de l'électrophorèse.
Paris, Presses Universitaires de France, 1957.
- BLOCK R., DURRUM E.L. et ZWEIG G. :
Paper chromatography and paper electrophoresis.
2nd edition. Academic Press, 1958.
- CHAPEVILLE F., CLAUSER H. :
Biochimie.
Paris, Hermann, 1974, 860 p., ill.
- CHIN H.P. :
Cellulose acetate electrophoresis. Techniques and applica-
tions.
Michigan, Ann. Arbor Sciences Publishers, 1970.
- FISCHER L. :
An introduction to gel chromatography.
Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1971, 396 p.,
ill.
- GORDON A.H. :
Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch
gels.
Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1969, 149 p.,
ill.
- GREGOIRE P.E. :
Biochimie pathologique.
Paris, Maloine, 1972, 1180 p.
- HARTMAN L. :
Techniques modernes de laboratoire et explorations fonction-
nelles.
Paris, l'Expansion Scientifique Française, 1971, 759 p., ill.
- HASCHEMEYER R. et HASCHEMEYER A.E.V. :
A guide to study proteins by physical and chemical methods.
New York, Wiley Interscience, 1973, 445 p., ill, Bibliogr.

- JAVILLIER M. et POLONOVSKI M. :
Traité de biochimie générale 1, (II).
Paris, Masson et Cie, 1959, 1475 p., ill.
 - KAMATH S.H. :
Clinical biochemistry for medical technologists.
Boston, Little-Brown and Company, 1972, 259 p., ill.
 - * POLONOVSKI M. :
Biochimie médicale, 8ème édition, (III).
Paris, Masson et Cie, 1971, 739 p., graph.
 - * POLONOVSKI M.
Biochimie médicale (IV).
Paris, Masson et Cie, 1977, 508 p., graph.
 - * SCHMIDT E. et SCHMIDT F.W. :
Guide to practical enzyme diagnosis.
Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH, 1967, 112 p., ill.
 - SMITH I. :
Chromatography and electrophoresis techniques, 2nd edition.
New York, Wiley Interscience, 1968.
-

B. MEMOIRES ORIGINAUX

- * AMADOR E., DORFMAN L.E. et WACKER W.E.C. :
Serum lactic dehydrogenase activity : an analytical assessment of current assays.
Clin. Chem., 1963, 9, 391.
- BEARN A.G. et FRANKLIN E.C. :
Comparative studies on physical characteristics of heritable haptoglobins groups.
J. Exp. Med., 1959, 109, 55.
- BISERTE G. :
Device for electrophoresis on paper.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 416.
- BOYER S.M., FAINER D.C. et WILLIAMS E.J. :
Lactate dehydrogenase variants from human blood : evidence for molecular subunits.
Science, 1963, 141, 642.
- CHRAMBACH A., REISFELD R.A., WYCKOFF M. et ZACCARI J. :
A procedure of rapid and sensitive staining of proteins fractionned by polyacrylamide gel electrophoresis.
Analyt. Biochem., 1967, 20, 150.
- COLFS B. et VERHEYDEN J. :
Electrophoresis and sudan black staining of lipoproteins on gelatinised cellulose acetate.
Clin. Chim. Acta, 1967, 18, 325.
- * DAVIS B.J. :
Disc electrophoresis II, Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404.
- DEL CAMPO B.B. :
New simple technique for the multifractionation of serum proteins (18-21 fractions) on cellogel R.S. cellulose acetate strips.
Clin. Chim. Acta, 1968, 22, 475.
- DOLE V.P. et BRAUN E. :
The electrophoretic patterns of normal plasma.
J. Clin. Invest., 1944, 23, 708.
- DORFMAN L.E., AMADOR E. et WACKER W.E.C. :
Urinary lactic dehydrogenase III. An analytic validation of the assay method.
J. Amer. Med. Ass., 1963, 184, 1.

- FAZEKAS DE STE GROTH S., WEBSTER R.G. et DATYNER A. :
Two men staining procedures for quantitative estimation of
proteins of electrophoretic strips.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 377.
- FINE J.M. et WASZCZENKO E. :
Preparation of transparent starch gels after electrophoresis
Nature (Lond.), 1958, 181, 269.
- FINE J.M., MOURAY H. et MORETTI J. :
Etude de l'influence de la composition des tampons sur la
séparation des protéines dans l'électrophorèse sur gel d'ami-
don.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 346.
- GALATIUS-JENSEN F. :
Rare phenotypes in the Hp-system.
Acta Genet. (Basel), 1958, 8, 248.
- GIBLET E.R., HICKMAN C.G. et SMITHIES O. :
Serum transferrins.
Nature (Lond.) 1959, 183, 1589.
- GRASSMANN W. von, HANNIG K. et KNEDEL M. :
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung
der serumproteine auf filterpapier.
Deut. Med. Wochenschr., 1951, 76, 333.
- * HILL R. B. et LEVI C. :
Elevation of serum component in neoplastic disease.
Cancer Res., 1954, 14, 513.
- HSIEH K.M. et BLUMENTHAL H.T. :
Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91, 626.
- JENKS W.P. et DURRUM E.L. :
Paper electrophoresis as a quantitative method : the staining
of serum lipoproteins.
J. Clin. Invest., 1955, 34, 1437.
- KAPLAN A. et SAVORY J. :
Evaluation of cellulose acetate electrophoresis system for
serum proteins fractionation.
Clin. Chem., 1965, 11, 937.
- KOIW E. et GRONWALL A. :
Of protein bound carbohydrates after electrophoresis of serum
on filter paper.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, 4, 244.
- * LATNER A.L. et SKILLEN A.W. :
Clinical applications of lactic dehydrogenase isoenzymes.
Lancet, 1961, 2, 1286.

- * LATNER A.L. :
Isoenzymes.
Adv. Clin. Chem., 1967, 7, 69.
- LEES R.S. et HATCH F.T. :
Sharper separation of lipoproteins species by paper electrophoresis in albumin containing buffer.
J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 518.
- Mac DONALD R.P., SIMPSON J.R. et NOSSAL E. :
Serum lactic dehydrogenase. A diagnostic aid in myocardial infarction.
J. Amer. Med. Ass., 1957, 35, 161.
- MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P. et BRUNERIE M. :
Applications aux sérums pathologiques, aux urines et aux liquides d'ascite (néphrose lipoïdique, myélome multiple, cirrhose de Laennec) de la méthode de microélectrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 1951, 33, 1543.
- * MARKERT C.L. :
Lactate dehydrogenase isoenzymes : dissociation and recombination of subunits.
Science, 1963, 140, 1329.
- MORETTI J., BOUSSIER G. et JAYLE M.F. :
Réalisations techniques et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 1957, 39, 593.
- NANCE W.E. et SMITHIES O. :
New haptoglobin alleles : a prediction confirmed.
Nature (Lond.), 1963, 198, 869.
- * ORNSTEIN L. :
Disc electrophoresis I, background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321.
- PAGET M. et COUSTENOBLE P. :
Microélectrophorèse des protéines du sérum sur acétate de cellulose gélatineux.
Ann. Biol. Clin., 1965, 21, 1209.
- PAGET M. et COUSTENOBLE P. :
Microélectrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux et sur polyacétate de cellulose.
Ann. Biol. Clin., 1966, 24, 181.
- PARKER W.C. et BEARN A.G. :
Additional genetic variation of human serum transferrin.
Science, 1962, 137, 854.
- POULIK M.D. :
Starch gel electrophoresis in discontinuous system of buffers.
Nature (Lond.), 1957, 180, 1477.

- * PRESTON J.A., BRIERE R.O. et BATSAKIS J.G. :
Rapid electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate.
Amer. J. Clin. Pathol., 1965, 43, (3), 256-260.
- SCHEIDEGIGER J.J. :
Une microméthode de l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allerg., 1955, 7, 103.
- * SMITHIES O. :
Zone electrophoresis in starch gel : group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J., 1955, 61, 629.
- SMITHIES O. :
Zone electrophoresis and its applications to studies of serum proteins.
Adv. Prot. Chem., 1959, 14, 65.
- SMITHIES O. :
An improved procedure for starch gel electrophoresis : further variations in the serum proteins of normal individuals.
Biochem., J., 1959, 71, 585.
- SWAHN B. :
Studies on blood lipids,
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1953, 5, suppl. 9, 1-114.
- * THIERS R.E. et VALLEE B.L. :
Analytical considerations in serum enzyme determinations.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, 75, 214.
- URIEL J. :
Colorimetric detection of human caeruleoplasmin oxydase activity after electrophoresis in agar plates or after immunoelectrophoresis.
Nature (Lond.), 1958, 181, 999.
- VESELL E.S. :
Polymorphism of human lactate dehydrogenase isoenzymes.
Science, 1965, 148, 1103.
- * WACKER W.E.C., ULMER D.D. et VALLEE B.E. :
Metalloenzymes and myocardial infarction.
N. Engl. J. Med., 1956, 225, 449.
- * WACKER W.E.C. et SNODGRASS P.J. :
Serum LDH activity in pulmonary embolism diagnosis.
J. Amer. Med. Ass., 1960, 174, 2142.
- * WACKER W.E.C., ROSENTHAL M. et AMODOR E. :
Triad for the diagnosis of pulmonary embolism and infarction.
J. Amer. Med. Ass., 1961, 178, 8.

- * WACKER W.E.C. et DORFMAN L.E. :
Urinary lactic dehydrogenase activity 1. Screening method for
detection of cancer of kidneys and bladder.
J. Amer. Med. Ass., 1962, 181, 972.
 - * WEST M., HELLER P. et ZIMMERMAN H.J. :
Serum enzymes in disease III. Lactic dehydrogenase and
serum glutamic oxaloacetic transaminase in patients leukemia
and lymphoma.
Amer. J. Med. Sci., 1958, 235, 689.
 - * WROBLEWSKI F. :
The significance of alterations in lactic dehydrogenase
activity of body fluids in the diagnosis of malignant
tumors.
Cancer, 1959, 12, 27.
-

ASSOCIATION ANCIENS EXTERNES DES HOPITAUX DE MARSEILLE

Service Dactylographie-Offset

25, Rue Bravet - 13005 MARSEILLE - Tél. : 42.58.60
