

Variation des fréquences des isoenzymes de la LDH dans les muscles de bovins

J. BOUSSET

Laboratoire de Recherches sur la Viande de l'I.N.R.A., C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas, France

Les études des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase sont déjà fort anciennes. Dans un premier temps leur différenciation était essentiellement des recherches en pathologie humaine ; en effet les cellules des différents organes ont une distribution de fréquences des 5 isoenzymes particulière. Le cœur possède essentiellement l'isoenzyme 1 (4H) alors que les muscles renferment surtout l'isoenzyme 5 (4M) ; d'autres organes ont des distributions particulières comme le foie. L'étude de la composition en isoenzymes du sérum sanguin permet donc de savoir si les cellules d'un organe particulier se lysent à une vitesse anormale comme dans le cas de certains cancers. Les nombreux travaux de MARKERT avaient bien mis ces phénomènes en évidence. Cet auteur avait également montré que les isoenzymes sont des tétramères constitués de 2 types de protéines H et M. Si l'on fait subir des congélations et décongélations successives à une solution contenant une proportion connue des 2 protéines, on obtient des fréquences relatives d'isoenzymes qui correspondent aux fréquences chez de M dans les cellules sont déterminées génétiquement et des études de phylogénie ont pu être réalisées chez les poissons en étudiant les isoenzymes de la LDH. (SHAKLEE 1973). Dans les muscles depuis de nombreuses années des travaux comme ceux de VAN WIJHE et al (1964) avaient montré que les différentes fibres musculaires possédaient des répartitions de fréquences différentes. Ces travaux ont surtout été appliqués en physiologie musculaire chez les sportifs, SJÖDIN (1976) et également pour l'entraînement des chevaux de courses (ANDERSON 1976).

Les muscles squelettiques étant constitués essentiellement de trois types de fibres (basés sur la physiologie de la contraction et le métabolisme) nous avons étudié la répartition de fréquences des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase dans différents muscles de bovins. Nous avons également dans une première approche tenté de voir, pour l'isoenzyme 5, comment cette fréquence pouvait être en rapport avec d'autres constituants biochimiques des muscles.

Matériel et méthodes

Matériel animal : quatre animaux ont été étudiés chez chacun d'eux ; 18 muscles ont été prélevés et immédiatement placés à 2°C, les échantillons d'analyse ont été pris dans la partie centrale du muscle et en plus pour les muscles importants 2 autres prises ont été réalisées au quart distal.

Muscles étudiés : Biceps femoris (1), (2), (3), semitendinosus (4), (5), (6), Vastus lateralis (7), Tensor fascia lata (8), Gluteus medius (9), Psoas major (12), Longissimus dorsi (15), (18), Tricipitis brachii caput laterale (30), Pectoralis profundus pars lateralis (31), (32), Semimembranosus (33), (34), (35), Rectus femoris (36), Supra spinatus (42), Adductor magnus (49), infra spinatus (57), Transversus abdominis (61), Rectus abdominis (62) Semispinalis capitis (67).

Méthodes analytiques

Azote déterminé : l'azote déterminé est réalisée selon le principe de la méthode de HORNSEY (1956) en utilisant la technique de l'azote protéique sarcoplasmique.

Extraction de la LDH : l'azote soluble est fractionné en trois parties : l'azote total, l'azote soluble, et l'azote non précipitable par le T.C.A. 5% selon la technique précédemment décrite BOUSSET (1980), l'azote protéique sarcoplasmique est présentement défini par (Azote soluble - Azote non précipitable au TCA / Azote total) 100.

Extraction des isoenzymes : l'extraction des isoenzymes est réalisée sur des échantillons frais ou congelés mais n'ayant pas subi de congélations et décongélations successives. Le produit est haché très finement puis extrait au 1/10 dans de l'eau par homogénéisation à l'ultraturax 3 fois 1 minute. L'extrait est centrifugé 10 minutes à 10 000g. Une aliquote du surnageant est diluée 5 fois par une solution aqueuse de saccharose à 40%. L'électrophorèse est réalisée verticalement sur des plaques de gel d'acrylamide à 7,5%. La durée de migration est de 3 heures sous 20 volts/cm avec une intensité de 25mA ; le front de migration contrôlé par le bleu de bromophénol.

Coloration : la coloration des isoenzymes est réalisée de façon classique par formation de formazan à partir d'un sel de tetrazolium (MTT) en présence de PMS de NAD et de lactate.

Densitométrie : après densitométrie des plaques on calcule les proportions des différentes isoenzymes.

Résultats

Variation des fréquences des isoenzymes

Le tableau 1 rapporte les résultats obtenus pour les 4 animaux dans différents muscles. Si l'on considère un muscle particulier on constate que les fréquences pour les trois premiers animaux sont sensiblement les mêmes et qu'elles sont légèrement différentes pour l'animal D ; ceci est vrai quelque soit le muscle et quelque soit l'isoenzyme considérée. Cet animal D est plus pauvre en isoenzyme 5 et plus riche en isoenzyme 1. Au tableau 1 on constate également que pour l'isoenzyme 5 ou 1 le classement des différents muscles est sensiblement toujours le même et presque inverse pour l'enzyme 5 et 1. Les fréquences vont du simple au double lorsque l'on passe du muscle transversus abdominalis au semimembranosus pour l'isoenzyme 5 ; on peut même aller de 0,17 à 0,75 si l'on considère des muscles comme le Diaphragma pars costalis et le Cutaneus trunci.

On peut également remarquer que l'isoenzyme 5 qui est théoriquement l'isoenzyme musculaire peut dans certains cas être à égalité et même légèrement inférieure à l'isoenzyme 1. Dans tous les cas l'isoenzyme 3 est relativement importante chez le boeuf.

Muscles	Animaux	iso 5	iso 4	iso 3	iso 2	iso 1
Semimembranosus (33)	A	0,70	0,11	0,11	0,06	0,02
	B	0,72	0,09	0,12	0,05	0,02
	C	0,73	0,09	0,11	0,05	0,03
	D	0,56	0,13	0,16	0,10	0,04
Semitendinosus (4)	A	0,62	0,13	0,15	0,07	0,02
	B	0,69	0,10	0,13	0,06	0,03
	C	0,65	0,11	0,16	0,07	0,02
	D	0,52	0,10	0,19	0,11	0,07
Adductor brevis et magnus (49)	A	0,58	0,13	0,17	0,10	0,03
	B	0,58	0,10	0,19	0,10	0,03
	C	0,66	0,10	0,16	0,06	0,02
	D	0,51	0,13	0,19	0,13	0,05
Supraspinatus (42)	A	0,35	0,13	0,19	0,17	0,16
	B	0,40	0,11	0,19	0,14	0,17
	C	0,44	0,10	0,18	0,13	0,15
	D	0,32	0,12	0,20	0,17	0,19
Infra spinatus (57)	A	0,34	0,13	0,18	0,16	0,18
	B	0,34	0,09	0,22	0,15	0,20
	C	0,33	0,09	0,20	0,18	0,21
	D	0,26	0,12	0,20	0,19	0,22
Transversus abdominis (61)	A	0,38	0,10	0,18	0,15	0,19
	B	0,32	0,08	0,20	0,15	0,24
	C	0,32	0,09	0,19	0,16	0,24
	D	0,26	0,10	0,17	0,19	0,28

Tableau 1 Répartition des isoenzymes de la LDH dans différents muscles

N° Muscle	Animal A			Animal B			Animal C			Animal D			classements moyens		
	LDH	Fer	Az	LDH	Fer	Az	LDH	Fer	Az	LDH	Fer	Az	LDH	Fer	Az
33	1	18	8	2	13	12	1	13	5	3	11	2	1	14	4
34	2	11	2	3	14	5	2	12	6	1	11	5	2	11	19
4	5	2	12	4	2	24	6	2	18	5	4	18	3	13	8
35	7	21	1	9	16	3	4	11	3	4	8	27	4	1	15
6	6	1	9	1	1	11	3	1	26	11	1	16	5	17	9
7	3	14	20	5	15	1	7	18	7	8	16	12	6	21	22
49	9	24	21	11	22	21	5	20	16	7	18	24	7	5	3
18	14	8	4	6	4	6	9	5	9	10	2	1	8	3	18
5	10	4	19	8	3	17	11	3	17	15	5	17	9	4	11
8	4	3	7	14	5	19	10	4	1	11	6	15	10	6	1
15	15	6	3	7	8	2	12	6	2	9	3	4	11	12	12
3	11	5	11	20	18	13	8	16	15	6	7	10	12	15	13
1	8	16	14	12	12	18	15	14	9	2	13	9	13	22	6
9	12	26	6	15	21	10	13	23	12	13	20	3	14	7	16
36	13	7	16	13	7	25	14	8	14	16	14	13	15	9	5
12	17	15	10	18	9	8	16	14	4	18	9	7	16	13	14
32	18	12	13	19	12	7	18	10	11	15	17	26	17	10	7
31	19	9	5	16	10	9	19	7	8	17	15	11	19	20	17
2	16	19	22	10	6	14	20	26	19	20	21	14	18	24	10
21	21	27	18	17	17	4	17	21	13	21	24	6	20	8	20
62	23	10	15	23	11	16	22	9	19	19	9	25	21	18	21
30	20	13	17	21	19	20	23	19	24	22	23	20	22	19	24
42	25	17	25	23	23	23	20	17	21	23	21	19	23	27	26
72	22	22	27	22	24	22	25	25	25	24	27	21	24	24	27
67	26	25	24	25	25	26	24	24	23	25	25	23	25	25	22
61	24	23	23	27	26	15	27	27	22	27	19	22	26	23	24
57	26	20	27	26	20	27	26	22	27	26	26	8	27		

L.D.H. : lacticoxydohydrogénase isoenzyme 5 classée par importance décroissante
 Fer : Fer héminique classé par importance croissante
 Az : Azote protéique sarcoplasmique classé par importance décroissante

Tableau 2 Différents classements

Classement des différents muscles

Si l'on considère les classements de tous les muscles étudiés pour les 4 animaux (tableau 2) : pour l'isoenzyme 5 de la L.D.H., les classements sont sensiblement toujours les mêmes; par contre pour le fer héminique et surtout pour l'azote protéique sarcoplasmique ils sont un peu différents suivant les animaux. L'étude statistique de ces classements par le test de rang de SPEARMAN dont les résultats sont rapportés dans le tableau 3 fait apparaître que chez les différents animaux il y a toujours une bonne concordance entre l'augmentation de l'isoenzyme 5 et la diminution du fer héminique ; par contre en ce qui concerne l'azote protéique sarcoplasmique l'augmentation de celui-ci avec l'augmentation de l'iso 5 n'est significative que pour deux animaux seulement. La concordance des classements fer héminique/azote protéique sarcoplasmique est généralement plus faible. Si l'on considère les classements moyens pour les 4 animaux il apparaît que la concordance iso 5/Fer héminique et iso 5/Azote protéique sarcoplasmique est très forte, avec une bonne liaison fer héminique/azote protéique sarcoplasmique. Le classement établi en fonction de la fréquence de l'isoenzyme 5 de la lactico-déshydrogénase reflète sensiblement l'implantation cephalo-caudal des muscles sur la carcasse.

Classement intra animal

		rs	t	p
Animal A	LDH/Fer	0,36	2,25	0,05
	LDH/Az	0,48	3,33	0,01
	Fer/Az	0,39	2,50	0,05
Animal B	LDH/Fer	0,68	6,01	0,001
	LDH/Az	0,27	1,58	0,20
	Fer/Az	0,26	1,51	0,20
Animal C	LDH/Fer	0,60	4,74	0,001
	LDH/Az	0,54	3,98	0,001
	Fer/Az	0,39	2,50	0,05
Animal D	LDH/Fer	0,65	5,49	0,001
	LDH/Az	0,24	1,38	0,20
	Fer/Az	0,20	1,12	0,30
Classement moyen des animaux				
	LDH/Fer	0,60	4,74	0,001
	LDH/Az	0,60	4,74	0,001
	Fer/Az	0,44	2,94	0,01

ns27. L.D.H.=Lactico-déshydrogénase isoenzyme 5. Fer=Fer héminique. Az=Azote protéique sarcoplasmique

Tableau 3

Comparaison des classements ; test de SPEARMAN

Discussion

Une remarque préliminaire s'impose : certaines antités anatomiques n'ont aucune homogénéité biochimique au moins en ce qui concerne les isoenzymes de la L.D.H. ; c'est le cas par exemple de l'obturatorius internus dont les résultats sont rapportés dans le tableau 4 ; par contre pour les autres muscles étudiés les variations intra muscle ne semblent pas être trop importantes par exemple le semimembranosus, le semitendinosus et le biceps femoris.

Prélèvements	iso 5	iso 4	iso 3	iso 2	iso 1
1	0,62	0,09	0,10	0,07	0,10
2	0,51	0,13	0,12	0,09	0,16
3	0,36	0,12	0,13	0,14	0,25
4	0,31	0,12	0,17	0,19	0,21
5	0,17	0,08	0,19	0,26	0,29

Tableau 4

Variabilité de la distribution de fréquences à l'intérieur d'un muscle

La concordance des classements réalisés pour les différents muscles basés sur les valeurs décroissantes de l'isoenzyme 5 de la L.D.H. et celui réalisé sur les valeurs croissantes du fer héminique n'est pas surprenante ; elle s'explique très bien au niveau du métabolisme cellulaire. Les travaux de KAPLAN ont bien montré que l'isoenzyme 5 est spécialement adaptée aux transformations pyruvate lactate en métabolisme anaérobie ; donc les cellules riches en isoenzyme 5 sont à orientation anaérobie et ont de ce fait une concentration en fer héminique faible qui traduit, elle, une orientation aérobie du métabolisme. Que la concordance ne soit pas absolue peut provenir à la fois du fait de la précision relative des analyses des fréquences des isoenzymes de la L.D.H. et également du fait que l'on travaille sur des échantillons qui représentent une population de fibres musculaires. L'explication de la relative concordance entre les classements établis sur l'isoenzyme 5 et l'azote protéique sarcoplasmique peut être donnée également par les orientations métaboliques des fibres. L'abondance d'isoenzyme 5 est plus ou moins liée à un métabolisme anaérobie ; or les fibres possédant ce métabolisme ont un équipement glycolytique important et une grande partie de l'azote protéique sarcoplasmique est constituée par les enzymes de la glycolyse (SCOPES 1970). Il est donc normale qu'à un niveau élevé de l'isoenzyme 5 corresponde une proportion élevée de l'azote sous forme protéique sarcoplasmique. La formulation différente des résultats associée à une méthode de calcul plus élaborée appliquée aux isoenzymes de la L.D.H., actuellement en cours de dépouillement, fait apparaître que c'est bien au niveau métabolique que semble se situer la liaison entre les fréquences d'isoenzyme de la L.D.H., le fer héminique et l'azote protéique sarcoplasmique.

La méthode de calcul ci-dessus évoquée devrait permettre d'obtenir une estimation de la composition en fibre des muscles et par la même de lever en partie l'hétérogénéité inhérente au muscle, hétérogénéité qui perturbe ou au moins rend peu fiable, l'échantillonnage dans la masse musculaire, ce qui peut entraîner dans des études consacrées à l'évolution, dans le temps, des formes de l'azote, par exemple, des erreurs d'interprétations regrettables.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Marie-Thérèse MERA et Eléonore HUDZIK.

Références bibliographiques

- ANDERSON M.G. 1976 Res. Vét. Sci., 20 191-196
 BOUSSET J. 1980 26ème Congrès des Chercheurs en Viande. Colorado Springs Vol 1 87-90
 HORNSEY H.C. 1956 J. Sci. Food Agric., 7 534-540
 KAPLAN N.O. 1975 in Isoenzymes Academic Press.
 MARKERT Cl.L. 1975 Isoenzymes Academic Press.
 SCOPES R.K. 1970 The physiology and biochemistry of Muscle as a Food ed. BRISKEY, CASSENS, MARSH. P. 474
 SHAKLEE J.B., KEPES K.L., WHITT G.S. 1973 J. exp. zool., 185, 217-240;
 SJÖDIN B. 1976 Acta physiol. Scand., suppl. 436 1-32
 SPEARMAN C. 1904 Amer. J. Psych. 15 88 in SNEDECOR G.W., COCHRAN 6ème Ed. 1957
 VAN WIJHE M., BLANCHAER M.C., GEORGE-STÜBBS S. St. 1964 J. Histochem. cytochem., 12 608-614