

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DES DÉHYDROGÉNASES DE L'ACIDE LACTIQUE ET DE L'ACIDE MALIQUE DU LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN ET DES EXTRAITS CÉRÉBRAUX CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL

A. LOWENTHAL, M. VAN SANDE et D. KARCHER

*Laboratoire de Neurochimie, Service de Neurologie,
Institut Bunge, Berchem-Anvers, Belgique*

INTRODUCTION

Les méthodes d'analyse électrophorétique et chromatographique ont permis au cours des dernières années de subdiviser en plusieurs fractions la déhydrogénase de l'acide lactique (LDH), la déhydrogénase de l'acide malique (MDH), les transaminases, la céruloplasmine, les phosphatases et les estérases.

Le fractionnement de ces enzymes a suscité de nombreuses discussions et soulevé de nouveaux problèmes, parmi lesquels:

(a) on s'est demandé quelle pouvait être l'origine de ces diverses fractions et on s'est demandé si elles ne pouvaient pas provenir de tissus différents;

(b) on s'est demandé si les fractions ainsi obtenues possédaient des propriétés physico-chimiques distinctes.

Plagemann, Gregory et Wróblewski¹ ont montré que la thermosensibilité des diverses fractions de la LDH était différente, et que la cinquième fraction était la plus sensible à l'élévation thermique. Ils ont supposé qu'il existe un rapport entre mobilité électrophorétique et sensibilité thermique.

Dans le but de vérifier ces hypothèses, nous avons étudié le fractionnement de la LDH et de la MDH dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les protéines cérébrales par la méthode décrite par Wieme sous le nom d'enzymo-électrophorèse².

MÉTHODES

La technique utilisée est l'enzymo-électrophorèse* de Wieme appliquée au LCR³ et aux protéines hydrosolubles du système nerveux central⁴. L'extraction des protéines hydrosolubles se fait comme suit: un fragment de tissu nerveux pesant a g est mélangé manuellement intimement à $3 a$ ml d'une solution isotonique de saccharose, et soumis à la centrifugation à une vitesse de 14 000 g à une température de 0 à -5° . La liqueur surnageante est alors soumise à l'électrophorèse, exactement comme le sérum ou le LCR concentré. Les teneurs en LDH et en MDH totales ont été calculées selon

* La concentration de chaque fraction est calculée par planimétrie de la courbe des densités optiques. La mobilité relative est mesurée par comparaison avec une solution standard A (albumine humaine), S (sidérophiline) et M (macrodex ou dextrane dépolymérisé).

la méthode de Beisenherz, Boltze, Bücher, Czok, Garbade, Meyer-Arendt et Pfeiderer⁵ ou de Wróblewski⁶.

RÉSULTATS

Concentrations et mobilités relatives des diverses fractions

Après Wieme, nous avons trouvé dans le sérum cinq fractions nettement distinctes. Dans certains sérums, dont la teneur en LDH ou MDH est pathologiquement augmentée (myopathies), nous obtenons des courbes semblables aux courbes normales, *mais les différences de niveau entre les divers pics sont plus marquées.*

Dans le LCR, l'activité LDH est à peu près le 1/10 de l'activité LDH du sérum, alors que la teneur en protéines du LCR est de 200 à 300 fois inférieure à celle du sérum. Il faut donc admettre que le sérum présente, par rapport à sa teneur en protéines, une activité LDH moins marquée que le LCR. Les extraits cérébraux sont plus riches, relativement à leurs teneurs en protéines, que le sérum en activité LDH (± 250 fois) et MDH (± 1000 fois). Les rapports qui peuvent exister entre les concentrations en protéines et l'activité enzymatique des liquides étudiés, devraient donc être définis de façon plus précise. Il s'agit là d'un premier problème que nous pouvons poser, mais pour lequel nous n'avons pas de solution à présenter pour le moment.

Tableau 1. Mobilités relatives, exprimées par rapport à l'albumine humaine, des différentes fractions de la LDH et de la MDH dans des extraits cérébraux

A. Déshydrogénase de l'acide lactique (LDH)

Tissu	Nombre de cas	Mobilité électrophorétique relative de la fraction :				
		1	2	3	4	5
Substance grise	15	0,881	0,665	0,468	0,239	0,044
Substance blanche	15	0,890	0,672	0,461	0,233	0,044
Liquide céphalo-rachidien	74	0,910	0,677	0,456	0,241	0,073
Sérum	11	0,932	0,691	0,454	0,218	0,021

B. Déshydrogénase de l'acide malique (MDH)

Tissu	Nombre de cas	Mobilité électrophorétique relative de la fraction :					
		1	2	3	4	5	6
Substance grise	15	1,073	0,908	0,666	0,392	0,227	0,049
Substance blanche	15	1,028	0,895	0,663	0,404	0,255	0,092
Liquide céphalo-rachidien	40	1,067	0,905	0,681	0,404	0,255	0,029

Les mobilités relatives (m_r) des diverses fractions de la LDH sont identiques dans le sérum, le LCR et les extraits cérébraux (Tableau 1), mais ne coïncident pas toujours avec les mobilités relatives des fractions protéiniques telles que nous avons pu les mettre en évidence par coloration à l'amido-

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA LDH ET DE LA MDH

schwarz. Dans certaines régions du phérogramme, on trouve une activité enzymatique importante, alors qu'il n'est pas possible de mettre en évidence avec l'amido-schwarz à ce même niveau une fraction protéinique. Cela ne signifie certes pas qu'il n'y a pas de protéines à ce niveau, et il est possible que d'autres indicateurs colorés montreraient une fraction à ce niveau, mais cela prouve que l'activité enzymatique est dans certains cas un meilleur indicateur de la présence d'une protéine que l'amido-schwarz. Ce fait est particulièrement intéressant lorsque l'on étudie la MDH. On trouve en effet dans le LCR humain une activité MDH importante, représentant près de 60 pour cent de l'activité totale, avec une m_r de 0,400. Dans le sérum, la β -2-globuline a la même m_r . Dans le LCR, à ce même niveau, par contre, on ne trouve qu'exceptionnellement une fraction protidique colorable à l'amido-schwarz. Ainsi, l'enzymo-électrophorèse de la MDH démontre qu'au moins un des constituants de la β -2-globuline du sérum, celui qui serait porteur de l'activité MDH, se retrouve également dans le LCR. L'activité enzymatique est donc ici un meilleur indicateur de la présence de certaines protéines que l'amido-schwarz.

Enfin, si l'on compare la distribution quantitative des diverses fractions de la LDH, on constate que si la fraction 1 est la plus importante dans le LCR, dans le sérum et les extraits cérébraux la fraction 2 est la plus importante* (Tableau 2).

Tableau 2. Concentrations relatives (pour cent) des différentes fractions de la LDH et de la MDH dans des extraits cérébraux (15 cas)

A. Déshydrogénase de l'acide lactique (LDH)

Tissu	Concentration relative (%) de la fraction:				
	1	2	3	4	5
Substance grise	20,8	24,1	26,6	20,1	8,6
Substance blanche	21,3	27,6	25,7	19,4	7,0

B. Déshydrogénase de l'acide malique (MDH)

Tissu	Concentration relative (%) de la fraction:					
	1	2	3	4	5	6
Substance grise	12,1	12,4	12,5	53,1	7,0	4,0
Substance blanche	14,9	12,1	12,0	50,5	8,9	3,2

Les résultats que nous venons de rapporter permettent donc de noter que les activités enzymatiques des protéines du sérum, du LCR et des extraits cérébraux peuvent être quantitativement différentes et que l'enzymo-électrophorèse d'autre part, dans certains cas, pourrait être un bon indicateur de la présence des fractions protidiques. Ils ne nous donnent aucun argu-

* Les différentes fractions enzymatiques ont été indiquées comme les fractions électrophorétiques, c'est-à-dire que la fraction la plus rapide est indiquée par le chiffre le plus bas et la fraction la plus lente par le chiffre le plus élevé.

ment en faveur de l'hypothèse que les diverses fractions auraient une origine tissulaire différente.

Thermosensibilité des diverses fractions

Plagemann, Gregory et Wróblewski¹ ont décrit un phénomène que nous avons tenu à étudier pour les protéines du sérum, du LCR, du système nerveux central de l'homme et de certains animaux. Nous n'avons pas pu

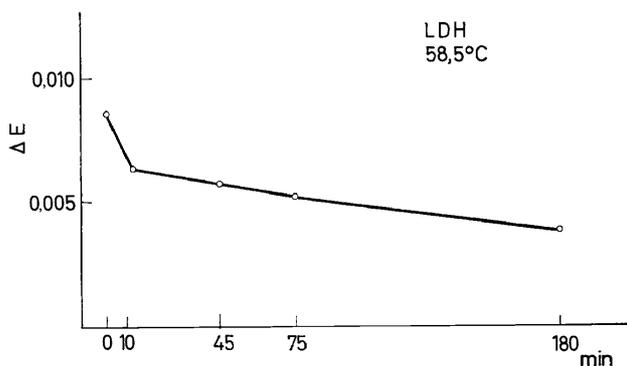


Figure 1. Diminution de l'activité (ΔE) de la LDH sous l'influence de la température (portée à 58,5°) dans des extraits protidiques cérébraux humains

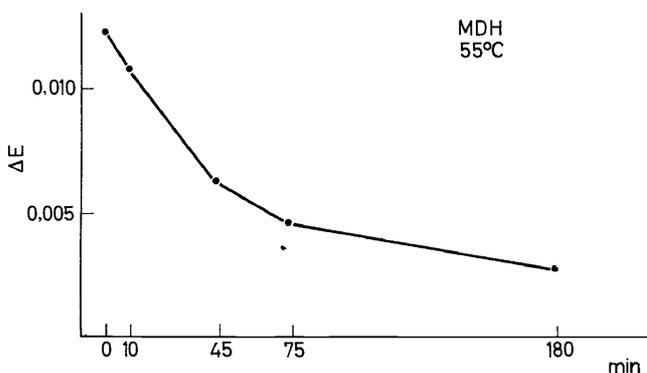


Figure 2. Diminution de l'activité (ΔE) de la MDH sous l'influence de la température (portée à 55°) dans des extraits protidiques cérébraux humains

travailler comme eux à 55° ou à 58° pour la LDH. Après divers essais nous avons étudié la thermosensibilité de la LDH à 58,5° et celle de la MDH à 55°. Nos extraits ont d'autre part été préparés comme nous l'avons indiqué plus haut, selon une méthode différente de celle utilisée par Plagemann, Gregory et Wróblewski¹. Il est donc possible que certains constituants de ces extraits aient modifié l'action de l'élévation thermique et ceci expliquerait le fait que nous avons dû travailler dans d'autres conditions que les auteurs américains.

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA LDH ET DE LA MDH

Les extraits obtenus sont immédiatement placés au bain-marie pour des périodes variant de 5 à 180 min. Des prélèvements sont effectués après 5, 10, 45, 75 et 180 min. Sur chacun des prélèvements une détermination de la teneur en LDH ou en MDH totale est pratiquée, et l'extrait est ensuite soumis à l'enzymo-électrophorèse. Dans la mesure du possible, la substance

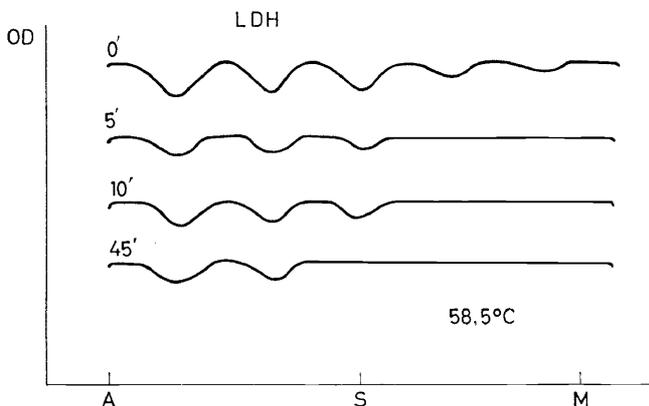


Figure 3. Thermosensibilité des diverses fractions de la LDH dans le LCR humain, porté à 58,5°

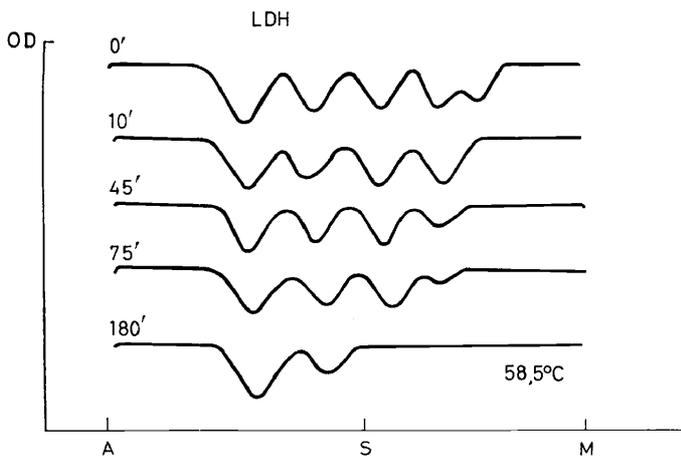


Figure 4. Thermosensibilité des diverses fractions de la LDH dans les extraits protidiques de cerveaux de lapins, portés à 58,5°

blanche et la substance grise ont été séparées. Des extraits provenant de localisations différentes ont été étudiés.

Les résultats obtenus montrent très clairement que l'activité déhydrogénasique diminue sous l'influence de la température (*Figures 1 et 2*). Les courbes ont en général la même allure, quoique les extraits utilisés et les températures auxquelles ils ont été soumis, fussent différents. La diminution d'activité est particulièrement marquée au cours des 10 premières minutes.

Les modifications apportées aux enzymo-électrophérogrammes sont par contre très nettement différentes: dans le LCR (*Figure 3*) et les extraits cérébraux humains, la fraction 5 et la fraction 4 de la LDH ont disparu au bout de 10 min. La fraction 3 a disparu après 45 min, et plus tard la fraction 2 peut également disparaître, tandis que la fraction 1 résiste le plus

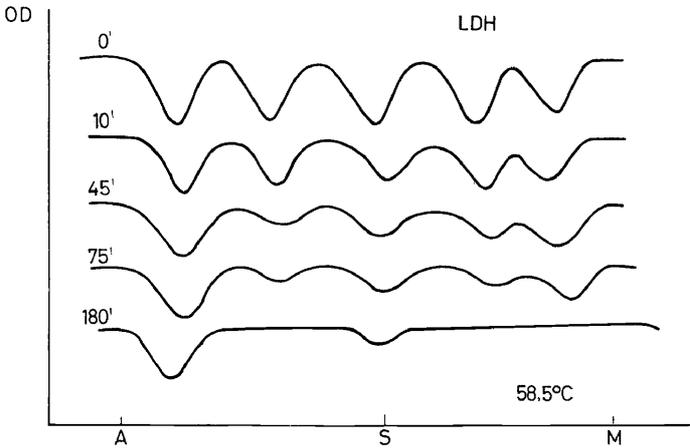


Figure 5. Thermosensibilité des diverses fractions de la LDH dans les extraits protidiques de cerveaux de rats, portés à 58,5°

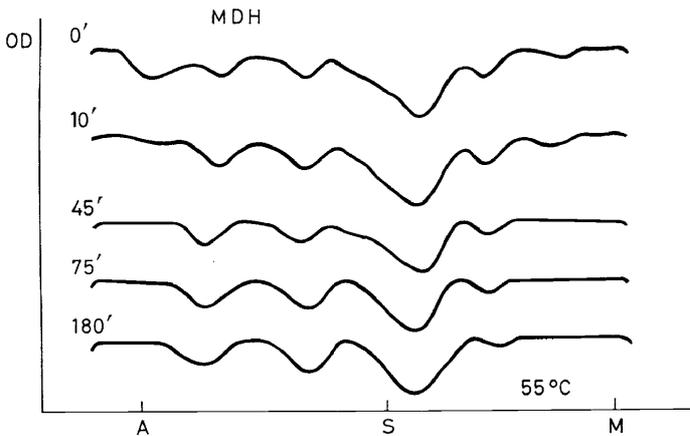


Figure 6. Thermosensibilité des diverses fractions de la MDH dans les extraits protidiques de cerveaux humains, portés à 55°

longtemps. Des résultats semblables avaient été obtenus par Plagemann, Gregory et Wróblewski¹ sur des extraits d'organes de lapins. Des extraits de cerveaux de lapins devaient nous donner des résultats comparables (*Figure 4*). Par contre, dans des cerveaux de rats, les fractions 2 et 4 sont celles qui disparaissent les premières (*Figure 5*).

Des recherches semblables ont été faites sur l'activité de la MDH. Dans

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA LDH ET DE LA MDH

nos conditions de travail, la MDH semble mieux résister à l'action de la température, malgré une nette diminution de son activité au cours des 10 premières minutes. Chez l'homme les fractions 1 et 6 sont certainement les plus thermosensibles (*Figure 6*). Chez le rat et le lapin nous ne trouvons que cinq fractions. La fraction la plus rapide, qui migre au niveau des préalbumines chez l'homme, manque ici. La fraction la plus lente semble être aussi le plus sensible à l'élévation thermique.

Les mobilités relatives (m_r) des diverses fractions ne sont par contre pas modifiées sous l'influence de la température (*Tableau 3*).

Tableau 3. Mobilités relatives des fractions de la LDH après chauffage à 58°

Temps de chauffage (min)	Mobilité électrophorétique relative de la fraction:				
	1	2	3	4	5
0	0,884	0,676	0,469	0,242	0,044
10	0,883	0,664	0,438	0,210	0,024
45	0,899	0,675	0,459	0,231	—
75	0,911	0,684	0,478	0,242	—
180	0,914	0,699	0,480	0,250	—

Nous ne pouvons pas admettre que la sensibilité à la température est une fonction de la mobilité électrophorétique. Cette thermosensibilité est différente selon l'espèce animale considérée et différente selon l'enzyme étudiée. Nous ne pouvons donc pas nous rallier aux conclusions de Plagemann, Gregory et Wróblewski¹ concernant les rapports entre la mobilité électrophorétique et la thermolabilité des fractions enzymatiques. Les différences de thermosensibilité, que Plagemann, Gregory et Wróblewski ont été les premiers à mettre en évidence, sont, à notre avis, des propriétés indépendantes de la mobilité électrophorétique. Elles constituent un argument important en faveur de l'hypothèse que les diverses isoenzymes de la LDH et de la MDH ont des propriétés physiques et chimiques différentes.

DISCUSSION

Nous avons commencé ce travail avec l'espoir de retrouver, par l'étude du LCR ou des extraits protidiques cérébraux, des fractions enzymatiques caractéristiques du tissu nerveux et différentes de celles du sérum. Cette hypothèse n'a pas reçu confirmation. Nous avons pu confirmer que les enzymo-électrophérogrammes de l'homme et de l'animal donnent des courbes comparables, quoique les mobilités électrophorétiques des diverses fractions soient différentes. Ceci rappelle évidemment les différences de m que montrent les phérogrammes sériques dans les diverses espèces animales.

La thermosensibilité des diverses fractions ne dépend pas de leur mobilité électrophorétique, elle est différente suivant l'espèce animale étudiée.

Nous ne croyons pas pouvoir aller plus loin pour le moment. Nous terminons donc plus sur une hypothèse de travail que sur des solutions aux problèmes posés. Nous pensons que pour obtenir d'autres indications il

nous faut étudier un plus grand nombre d'espèces animales et un plus grand nombre d'enzymes.

Sommaire

L'étude enzymo-électrophorétique du LCR et des extraits protidiques cérébraux chez l'homme et chez l'animal n'a pas permis de confirmer l'hypothèse que chacune des diverses fractions enzymatiques a une origine tissulaire différente. La thermosensibilité des diverses fractions mises en évidence semble être indépendante de leur mobilité électrophorétique.

Ce travail était effectué en partie grâce à un subside du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Belgique) et des National Institutes for Health des États-Unis d'Amérique (Grant B23-16).

Références

- ¹ P. G. W. Plagemann, K. F. Gregory et F. Wróblewski. "Die elektrophoretisch trennbaren Lactat-dehydrogenasen des Säugetieres: III. Einfluss der Temperatur auf die Lactat-dehydrogenasen des Kaninchens", *Biochem. Z.*, **334**, 37 (1961)
- ² R. J. Wieme. *Clin. Chim. Acta*, **6**, 46 (1959)
- ³ A. Lowenthal, M. van Sande et D. Karcher. "Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase of cerebrospinal fluid", *Neurochemistry*, **7**, 135 (1961)
- ⁴ A. Lowenthal, M. van Sande et D. Karcher. "Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in serum, cerebrospinal fluid and brain extracts (man and sheep)", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press
- ⁵ G. Beisenherz, H. J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt et G. Pfeleiderer. *Z. Naturforsch.*, **8b**, 555 (1953)
- ⁶ F. Wróblewski. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **90**, 210 (1955)