

Isoenzymes de la lactate deshydrogenase au niveau des organes de l'appareil génital du rat mâle greffé avec une tumeur de la glande interstitielle du testicule

Dans une note précédente¹ nous avons étudié comparativement l'activité de la lactate deshydrogénase (LDH) au niveau de divers organes chez des rats d'âges et de sexes variés soumis à une imprégnation androgénique constante du fait de la présence de la greffe d'une tumeur de la glande interstitielle du testicule.

On sait que la LDH montre un maximum de 5 formes multimoléculaires ou isoenzymes dans la plupart des tissus. Il est admis que les isoenzymes sont des tétramères constitués de deux sortes de sous-unités: l'une appelée sous-unité H, qui prédomine dans le tissu cardiaque, et l'autre appelée sous-unité M, qui prédomine dans le muscle strié. L'arrangement de ces deux sous-unités donne 5 possibilités: ce sont les isoenzymes H₄, MH₃, M₂H₂, M₃H et M₄ notés respectivement LDH₁ à LDH₅. Le pourcentage de sous-unité M que contient la LDH d'un certain tissu est donné simplement par la relation: $\% M = \frac{1}{4} [(MH_3) + 2(M_2H_2) + 3(M_3H) + 4(M_4)]$ où chaque terme entre parenthèses représente la participation en pourcentage de l'isoenzyme à l'activité totale.

Cependant l'identification d'un ou plusieurs isoenzymes supplémentaires, appelés LDH-X, au niveau des spermatozoïdes et des testicules, indique que la nature moléculaire de la LDH est plus complexe qu'on ne l'a pensé primitivement.

Dans le présent travail nous nous sommes attachés à l'étude comparative des isoenzymes de la LDH chez les rats mâles greffés, à l'âge de quarante jours, avec une tumeur de la glande interstitielle du testicule, en utilisant la technique d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

Matériel et méthode. Quatre séries de 10 rats mâles de souche Wistar, âgés de 40 jours, sont constituées. Chaque série est divisée en 2 lots égaux: un lot sert de témoin, l'autre lot est greffé avec la tumeur de la glande interstitielle du testicule.

Les séries sont sacrifiées aux 15, 30, 45, et 60ième jours après la greffe par exanguination et disclocation cervicale. La prostate, les vésicules séminales et les testicules sont prélevés chez tous les animaux; en outre, la tumeur est

également conservée chez les animaux greffés. Les organes sont alors lavés dans du tampon Phosphate 0,2 M pH7, 4-NaCl 0,9%, gardés à -20°C jusqu'à utilisation. Les extraits sont obtenus en homogénéisant les organes au broyeur de Potter-Elvehjem puis en centrifugeant à 30 000 g. Le surnageant est aussitôt utilisé pour déterminer l'activité de la LDH¹. Les protéines sont dosées en utilisant la méthode du biuret². L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5,5% d'acrylamide est faite selon la technique de DIETZ et LUBRANO³. La quantité d'enzyme déposée sur le sommet du gel pour l'électrophorèse est de 0,015 à 0,025 UI selon le cas. Les isoenzymes sont ensuite révélés en incubant les gels à 37°C pendant 20 min dans le milieu décrit par FRITZ et al.⁴, soit en présence de lactate, soit en présence de (DL)- α -hydroxyvalérate de sodium pour localiser les LDH-X. Les gels sont alors lus au densitomètre et le tracé de ce dernier permet de calculer la contribution de chaque isoenzyme à l'activité totale. Les résultats sont enfin soumis à une analyse statistique par le test du *t* de Student.

Résultats. L'analyse des Tableaux I et II montre qu'entre les 55ième et 70ième jours de greffe on enregistre des modifications dans la répartition des isoenzymes 1, 2 et 5 notamment aussi bien chez les animaux traités que chez leurs témoins. En outre au niveau du testicule on assiste à une disparition temporaire de la LDH X₂. Un phénomène analogue a été observé par BLACKSHAW et ELKINGTON⁵ chez des animaux de 70 jours, mais l'isoenzyme X unique a été identifié comme étant le -X₂.

¹ R. CALLARD et D. RIVIERE, C. r. Soc. Biol., Paris 165, 1979 (1971).

² A. G. GORNALL, C. I. BURDAWILL et M. M. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

³ A. A. DIETZ et T. LUBRANO, Analyt. Biochem. 20, 246 (1967).

⁴ P. J. FRITZ, W. J. MORRISON, E. L. WHITE et E. S. VESELL, Analyt. Biochem. 36, 443 (1970).

⁵ A. W. BLACKSHAW et J. S. H. ELKINGTON, J. Reprod. Fert. 22, 69 (1970).

Tableau I. Effet de la greffe à 40 jours de la tumeur de la glande interstitielle du testicule sur l'activité relative (%) des isoenzymes de la LDH au niveau du testicule chez le rat (en haut) et enzymogramme de la même tumeur (en bas)

Isoenzymes	Contribution en % à l'activité totale (âge jours)							
	55 ou 15 jours de greffe		70 ou 1 mois de greffe		85 ou 1½ mois de greffe		105 ou 2 mois de greffe	
	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins
	{288,6} ^{a,c}	{353,3}	{381,4} ^b	{465}	{258,2}	{324,5}	{242,5} ^a	{315}
1	20	18,5	16,8	16	13,8	15	15,3	14,1
2	29,1	26,1	25,6	21,7	26,7	30,4	26,7	28,5
3	12,7	13	10,5	12,5	15,4	17,8	9,6	12,6 ^a
X ₁	21	23	20,7	20,4	33,6	29,4	19,9	20,6
X ₂	8,7	9,6	15,8	18,4	0	0	19,7	16,7
5	8,4	9,7	10,5	10,8	10,5	7,4	8,7	7,3
	{244,6}		{652}		{389,6}		{352,5}	
1			0		0		0	
2			8,9		9,8		12,5	
3			21,2		25,4		22,4	
4			36,7		40,8		33,3	
5			33,2		24		31,8	
Sous-unité de type M (%)			73,5		69,8		71,1	

^a $p < 1\%$. ^b $p < 10/100$. ^c Entre crochets est indiquée l'activité spécifique, en mUI/mg de protéines, de la LDH des organes considérés.

Tableau II. Effet de la greffe à 40 jours de la tumeur de la glande interstitielle du testicule sur l'activité relative (%) des isoenzymes de LDH au niveau des vésicules séminales (en haut) et de la prostate (en bas) chez le rat

Isoenzymes	Contribution en % à l'activité totale (age jours)							
	55 ou 15 jours de greffe		70 ou 1 mois de greffe		85 ou 1 $\frac{1}{2}$ mois de greffe		105 ou 2 mois de greffe	
	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins	Greffés	Témoins
	{118,6} ^c	{79,9}	{313,5} ^a	{238,3}	{163,6}	{126,8}	{195,4}	{149,3}
1	18,6	21,4	3,9	4,2	1,5	2,4	2,2	4,7
2	23,2	23,2	14,3	16,3	9,8	12,8	13,7	16,9
3	19	18,7	23,4	25,9	19,4	22,6	22,8	28,4 ^b
4	17,3	18,3	26,3	26,8	26,3	26	25,7	25,8
5	21,9	18,4	32,1	26,8	43	36,2	35,6	24,2 ^a
Sous-unité de type M (%)	50,2	47,2	67,1	63,9	75	70,2	67,5	61,9
	{219,9}	{241,6}	{162}	{112,7}	{202,2}	{193,7}	{210,1}	{191}
1	18,8	16,3	0	0	0	0	0	0
2	20,4	18,3	7,7	8,4	4,6	6,3	6,8	7,8
3	17,7	17	12,6	16,1	11,4	13,8	12,2	14,1
4	24,2	22,4	19,9	24	21,9	23,8	22,5	22,4
5	18,9	26	59,8	51,5	63,1	56,1	58,5	55,7
Sous-unité de type M (%)	51,3	55,9	82,8	79,6	85,9	82,3	83,2	81,5

^a $p < 1\%$. ^b $p < 1\%$. ^c Entre crochets est indiquée l'activité spécifique, en mUI/mg de protéines, de la LDH des organes considérés.

Discussion. On constate une modification progressive de la proportion de LDH₅ au niveau des vésicules séminales et cela dans le sens d'une augmentation chez les animaux greffés, se traduisant également par une augmentation de la sous-unité de type M de l'enzyme. La significativité des différences enregistrées entre animaux témoins et greffés renseigne sur l'importance du phénomène: en même temps que l'on constate une augmentation du poids de l'organe⁶ et une activité spécifique de l'enzyme supérieure à celle des témoins, on observe aussi une tendance du métabolisme à devenir plus anaérobie, d'une part lors du passage de l'animal de l'état impubère à l'état pubère, et d'autre part, mais dans une moindre mesure, sous l'effet de la greffe de la tumeur. Ce phénomène avait déjà été observé par GOODFRIEND et KAPLAN⁷ chez le rat immature après injection de 1,5 mg de testostérone par jour pendant 3 jours: le pourcentage de la sous-unité M passait de 45% à 63%, valeurs proches de celles observées chez les animaux témoins impubères (47,2%) de 55 jours et pubères (63,9%) de 70 jours de l'expérience décrite ici.

Cependant, la prostate, organe-cible par excellence de la testostérone, n'est pas altérée au niveau du diagramme des isoenzymes de la LDH en comparant les animaux témoins et greffés. On note simplement une modification de ce diagramme lors du passage de l'animal de l'état impubère à l'état pubère, c'est à dire entre les 55ième et 70ième jour, contrairement aux auteurs précédemment cités. En effet, nos résultats indiquent une augmentation du pourcentage de la sous-unité M pendant cette même période: de 55,9% à 79,6% chez les animaux témoins, à 55 et 70 jours respectivement. Ceci laisse penser que des stéroïdes androgènes, autres que la testostérone, produits par la tumeur exercent une action propre, indépendamment de celle que l'on peut assigner à la testostérone seule.

La présence de la tumeur ne provoque pas d'effet très sensible au niveau de la LDH testiculaire. Le seul problème est celui de la disparition momentanée de la LDH-X₂. Des recherches ultérieures devraient pouvoir

permettre d'apporter un début de réponse à ce problème. En outre, l'analyse de l'enzymogramme de l'extrait tumoral, qui est en fait un extrait de cellules leydigiennes, indique clairement que celles-ci ne sont pas responsables de l'existence des LDH-X supplémentaires rencontrées spécifiquement au niveau du testicule.

Dans la série d'expériences décrites ici, la greffe de la tumeur permet d'étudier le comportement de l'organisme de l'animal comme ce dernier réagirait vis à vis d'un dérèglement endocrinien propre: les modifications observées sont progressives et sont le résultat de l'action complexe des métabolites sécrétés par la tumeur⁸. On sait que les androgènes, au niveau de certains organes, agissent sur la biosynthèse des protéines, ce qui a pour effet, entre autres, de modifier l'activité spécifique des enzymes¹. On constate par le présent travail que leur action sur les isoenzymes de la LDH est discrète sauf au moment du passage des animaux à l'état pubère, où la synthèse de la sous-unité M se trouve alors stimulée.

Summary. The LDH isoenzyme pattern was determined at the level of the genital apparatus organs in the male rat grafted with a testicular interstitial gland tumor. The seminal vesicles exhibit a modified pattern in the grafted animals after 2 months in comparison with the non-grafted rats. The pattern of the tumoral extract, in fact a true leydig cells extract, does not exhibit the specific testicular «band-X».

R. CALLARD

Laboratoire d'Histologie et Embryologie,
Faculté de Médecine, F-29279 Brest Cedex (France),
24 Avril 1972.

⁶ R. CALLARD, D. RIVIERE et M. R. RIVIERE, C. r. Soc. Biol., Paris 165, 1738 (1971).

⁷ T. L. GOODFRIEND et N. O. KAPLAN, J. biol. Chem. 239, 130 (1964).

⁸ C. BENASSAYAG, F. ENGELMAN, J. A. BEGUE, M. F. JAYLE, M. R. RIVIERE et R. COURRIER, Eur. J. Steroids 2, 383 (1967).