



HAL
open science

La biopsie d'endomètre : phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase, ses izoenzymes, au cours du cycle menstruel

Claude Feige

► To cite this version:

Claude Feige. La biopsie d'endomètre : phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase, ses izoenzymes, au cours du cycle menstruel. Modélisation et simulation. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1971. Français. NNT: . tel-00282777

HAL Id: tel-00282777

<https://theses.hal.science/tel-00282777>

Submitted on 28 May 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

N° d'Ordre :

**LA BIOPSIE D'ENDOMÈTRE. PHOSPHATASE ALCALINE, LACTATE
DÉSHYDROGÉNASE : SES ISOENZYMES, AU COURS DU CYCLE
MENSTRUEL**

THÈSE

présentée à la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Grenoble

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine

par **Monsieur FEIGE Claude**, né à Chambéry

soutenue publiquement le 25 juin 1971 devant la commission d'examen :

MM. Y. MALINAS
P. COUDERC
N. GASTINEL
M. COLOMB

Président :

**FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

N° d'Ordre :

**LA BIOPSIE D'ENDOMÈTRE. PHOSPHATASE ALCALINE, LACTATE
DÉSHYDROGÉNASE : SES ISOENZYMES, AU COURS DU CYCLE
MENSTRUEL**

THÈSE

présentée à la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Grenoble

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine

par **Monsieur FEIGE Claude**, né à Chambéry

soutenue publiquement le 25 juin 1971 devant la commission d'examen :

MM. Y. MALINAS
P. COUDERC
N. GASTINEL
M. COLOMB

Président :

A MA MERE

A MON BEAU-PERE

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FAMILLE

A TOUS LES MIENS

*qu'ils voient dans ce
travail le témoignage de mon
affection et de ma reconnais-
sance.*

A MA FEMME

A MA FILLE BENEDICTE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR V. MALINAS

Il nous a prodigué toujours avec bienveillance la richesse de son enseignement et de son expérience.

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de notre thèse.

Qu'il voit ici l'expression de nos hommages respectueux.

A MESSIEURS LES PROFESSEURS

COUDERC

CASTINEL

COLOMB

*Nous connaissons le prix
de leur présence parmi les
juges.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GAUTRAY

*Il nous a inspiré le
sujet de ce travail.*

*Nous le prions de bien
vouloir trouver ici notre
respectueuse reconnaissance.*

Nous remercions pour leur collaboration :

MONSIEUR ELBERART

MONSIEUR SIBUT

*dont la compétence et le dévouement
nous ont été précieux.*

et LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE MATHÉMATIQUES
APPLIQUÉES

MADAME FAURE

du LABORATOIRE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE du CENTRE HOSPI-
TALIER de GRENOBLE

LE PERSONNEL DU LABORATOIRE D'ENZYMOLOGIE du CENTRE
HOSPITALIER de GRENOBLE

A MES AMIS

et tout particulièrement :

à F. MADEIRE

*dont les qualités reconnues au cours d'une longue
amitié, se sont trouvées confirmées en ces circons-
tances.*

à Madame CIRJUD

que nous remercions pour son concours toujours aimable

à Monsieur et Madame NASEKA pour leur aide amicale

A MESDAMES LES SAGES-FEMMES

AU PERSONNEL DE LA MATERNITE ET DE LA CONSULTATION
DE LA CLINIQUE GYNECOLOGIQUE ET OBSTETRICALE

A MES AMIS DU CERTIFICAT D'ETUDES SUPERIEURES DE
GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE

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

La biopsie est devenue un geste de pratique quotidienne, rehaussée souvent de curiosité scientifique.

Les grands précurseurs de l'histologie pathologique au siècle dernier (SCHWANN, MULLER, VIRCHOW) utilisèrent la biopsie pour recueillir du matériel d'exploration scientifique. Mais presque aussitôt cette méthode gagne la pratique courante non sans quelque résistance.

C'est d'abord le simple examen de débris tissulaires détachés d'une tumeur : ainsi WALCHE dès 1843 utilise l'histologie de débris expectorés pour le diagnostic du cancer bronchique. Mais très vite, chacun dans sa spécialité eut l'idée de faire des prélèvements et nous ne saurions désigner le gynécologue qui le premier a employé ce procédé de diagnostic.

Le cycle de l'endomètre fut découvert vers 1900 par SCHROEDER et par ADLER sur des pièces d'hystérectomie (plus de 900 dans un travail de SCHROEDER). On ne connaît pas à cette époque les hormones génitales !

L'utilisation de ces travaux dans la pratique courante se heurtait aux difficultés rencontrées pour recueillir facilement des fragments d'endomètre.

Cependant la découverte des hormones génitales et de leur rôle désignait l'endomètre comme un récepteur de choix dont l'étude devenait indispensable.

L'histochimie a permis de mettre en évidence l'influence hormonale sur un tissu récepteur et les variations de l'activité enzymatique qui en découlent. Les méthodes biochimiques ont apporté avec précision la preuve de ces variations - JONES Jr H.W., WADE R., GOLDBERG B. (1952), puis SEGAL S.J., DAVIDSON O.W., WADA K (1965) ont les premiers tenté de comparer une activité enzymatique et une influence hormonale. Ces travaux ont permis de mettre en lumière l'action hormonale tissulaire, en particulier en faisant ressortir l'intérêt, pour la compréhension de ce mécanisme, du métabolisme des acides nucléiques et de l'activité de la synthèse protéique puisque les enzymes sont des protéines.

Il est permis de penser que les activités de synthèse des acides nucléiques et des protéines sont des étapes essentielles de l'action des oestrogènes au cours de la physiologie génitale : en effet l'administration d'acide ribonucléique utérin obtenu chez la rate castrée après injection d'oestrogènes, déclenche au niveau de l'utérus et du vagin d'autres femelles, castrées, des transformations identiques à celles que provoquent les oestrogènes ; en outre le blocage de ces effets est possible par l'application locale d'actinomycine D.

Le but que nous nous proposons serait de pouvoir servir de base à l'investigation clinique afin d'apprécier avec plus de finesse que par les moyens actuels, l'influence des oestrogènes au cours du cycle, au niveau de l'endomètre humain.

Le dosage de l'acide ribonucléique au niveau de l'endomètre nous a semblé une difficulté insurmontable, et nous nous sommes attachés :

dans la première partie de notre travail à compléter et à préciser des recherches antérieures sur la PHOSPHATASE ALCALINE :
thèse présentée le 15 Mai 1968 par Monsieur MAUREL Claude à la Faculté de Médecine de GRENOBLE,

dans la deuxième partie , à présenter une nouvelle voie de recherche constituée par l'étude de la LACTATE DESHYDROGENASE et de ses ISOENZYMES, étude qui nous semble riche en promesses.

DE LA BIOPSIE D'ENDOMETRE - NOTRE METHODE DE TRAVAIL

La biopsie d'endomètre est un prélèvement fragmentaire de la muqueuse tapissant la cavité corporeale de l'utérus.

Nous ne parlerons pas de la technique et des précautions indispensables avant la biopsie : une instrumentation de mieux en mieux adaptée en fait un examen de pratique courante. L'instrument le plus généralement adopté est la canule de NOVAK. Nous nous sommes contentés de l'introduire jusqu'au fond de l'utérus et d'appuyer légèrement. Si le col n'est pas trop étroit, la manoeuvre n'est pas trop douloureuse, bien que le contact de l'isthme soit assez sensible.

Les biopsies peuvent être renouvelées au cours du cycle : bien peu de patientes hélas, se sont prêtées à ce renouvellement. Ainsi dans l'impossibilité d'obtenir une biopsie d'endomètre par jour chez un même sujet sain, au cours du cycle normal, nous avons multiplié les prélèvements pour tenter l'approche statistique d'un cycle normal théorique.

Monsieur MAUREL présentait 106 observations. A la fin de nos travaux, notre matériel d'étude compte 252 biopsies d'endomètre, obtenues soit à la consultation de femmes présentant des troubles gynécologiques divers,

soit de façon systématique au cours de cycles normaux.

Chaque prélèvement a été divisé en 3 fragments :

- 1 premier fragment pour l'examen histologique.

- 1 deuxième fragment pour l'examen histochimique -
- 1 troisième fragment pour l'examen biochimique -

et nous nous donnons pour but de confronter les données et les résultats de ces trois études différentes.

DE LA METHODE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE

- 1) - UN PREMIER FRAGMENT DE NOTRE PRELEVEMENT EST DESTINE A UN EXAMEN HISTOLOGIQUE

Les modifications histologiques cycliques de l'endomètre sont un témoin fidèle de l'activité hormonale cyclique de l'ovaire. Cet examen donne lieu à une interprétation selon des critères traditionnels : actuellement nous sommes suffisamment avertis des états schématiques de l'endomètre au cours du cycle menstruel pour qu'il ne soit pas nécessaire d'aller au devant de redites. Les travaux sont multiples, en France ceux de MORICARD, ROBEY, PIAUX, ceux de NOYES, HERTIG, ROCK (1946-1966) aux Etats-Unis.

Nous nous reporterons au diagramme de "comparaison approchée de facteurs morphologiques utiles pour dater l'endomètre. Ces courbes représentent les changements quantitatifs approximatifs de huit facteurs paraissant les plus valables" (d'après J.P. GAUTRAY 1968, tiré de NOYES et coll. 1950).

Soulignons cependant que certains auteurs ont eu leur attention attirée par des détails de structure et d'ultrastructure dont la connaissance contribue à une meilleure compréhension de l'histologie de l'endomètre. En résumé, des travaux tels que ceux de J. de BRUX, J. DUPRE - FROMENT insistent sur le "complexe" hormonal qui détermine les variations de structure de la muqueuse corporéale. Pour L. DESCLIN "l'image endométriale est plus le reflet d'un état hormonal que celui d'un état morphologique ovarien précis" - E. PHILIPPE, J. RITTER, R. RENAUD (77) apportent des précisions nouvelles sur la structure de l'endomètre au cours du cycle normal en faisant une étude jour après jour. Ainsi découvrirent-ils des aspects peu ou mal connus des épithéliums glandulaires.

Considérant d'une part qu'une interprétation de l'ensemble de la muqueuse se fait à partir d'un fragment relativement minime, et tenant compte d'autre part des habitudes personnelles de l'observateur, nous obtenons une précision acceptable par rapport à une image de référence : datation histologique ramenée à l'évolution d'un cycle théorique de 28 jours avec répartition par bandes de 2 jours.

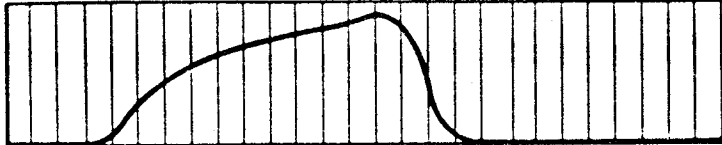
Classification de notre matériel d'étude

Grâce à cet examen histologique nous avons reconnu et éliminé les anomalies dystrophiques ou inflammatoires pour lesquelles la datation devient illusoire, bien souvent impossible. Cependant certains prélèvements ont montré une discordance entre la date clinique du prélèvement et la date histologique fixée dans les conditions précitées : il s'agit toujours de retards maturatifs non dystrophiques et nous les avons inclus aux observations pour l'établissement d'une comparaison des taux enzymatiques au cours du cycle.

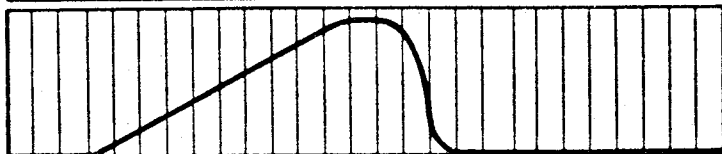
REGLES	PHASE PROLIFERATIVE			SECRETION
	precoce	moyenne	tardive	

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

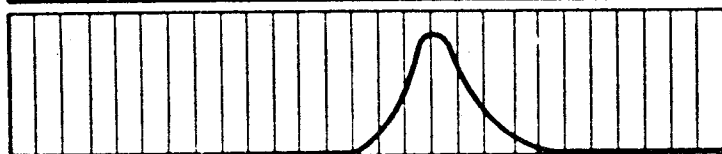
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



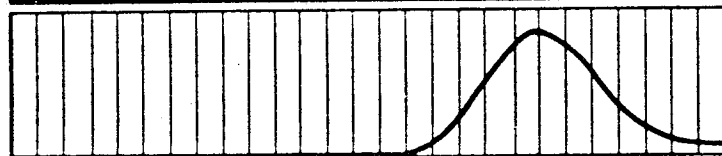
MITOSES DES CELLULES GLANDULAIRES
témoin de la prolifération. La réparation de l'endomètre commence déjà pendant la menstruation.



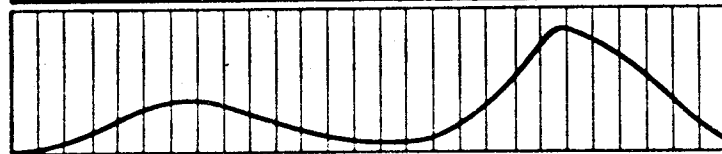
PSEUDOSTRATIFICATION DES NOYAUX
caractère typique de la phase proliférative, mais persiste jusqu'à la pleine activité de sécrétion.



APPARITION DE VACUOLES BASALES
signe morphologique le plus précoce au niveau de l'endomètre qui témoigne de l'ovulation, apparaît 36 à 48 heures plus tard.



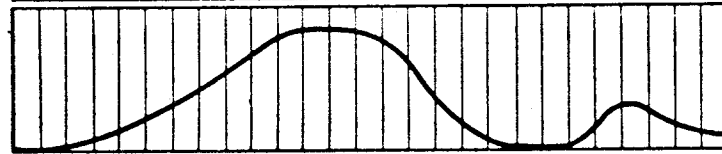
SÉCRÉTION
Cette courbe représente la sécrétion visible dans la lumière des glandes, la sécrétion active décroît plus brutalement.



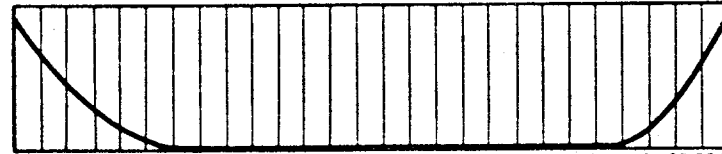
ŒDÈME DU STROMA
Constant au cours de la phase de sécrétion, son degré est variable. Inconstant en phase de prolifération.



TRANSFORMATION PSEUDODECIDUALE
évidente d'abord au niveau des capillaires, progresse jusqu'à former une couche compacte.



MITOSES DES CELLULES DU STROMA
essentiellement abondantes pendant la phase proliférative, réapparaissent lors de la transformation prédéciduale.



INFILTRATION LEUCOCYTAIRE
minime, mais quasi constante au cours du cycle, s'intensifie 3 à 4 jours avant la menstruation.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

REGLES	PHASE PROLIFERATIVE			SECRETION
	precoce	moyenne	tardive	

— *Comparaison approchée de facteurs morphologiques utiles pour dater l'Endomètre.* Ces courbes représentent les changements quantitatifs approximatifs de huit facteurs paraissant les plus valables (d'après NOYES et coll., 1950, modifié).

BIOPSIES d'ENDOMETRE réalisées 252

Compte-tenu des 106 biopsies
effectuées par M. MAUREL

CYCEES NORMAUX pour lesquels
la date clinique du prélèvement,
en jours du cycle, correspondait
à la date histologique déterminée
par la méthode habituelle, une va-
riation de 1 jour étant admise 101

Compte-tenu des 39 résultats
de M. MAUREL

CYCLES AVEC RETARD MATURATIF SIMPLE,
NON DYSTROPHIQUE : la date clinique
est supérieure de plus de 2 jours à ..
la date affectée au prélèvement par
l'histologiste 53

Compte-tenu des 19 cas de
M. MAUREL -

OBSERVATIONS ELIMINEES de notre étude 98

En grande partie : endomètre dystro-
phique avec asynchronisme de matura-
tion entre les glandes endométriales
et le stroma (chorion et vaisseaux-)

Egalement :-prélèvement trop superficiel,
-fragments tissulaires trop
petits -
-techniques histologiques
défectueuses
-Endomètre de cycles anovulatoires
de type préménopausique
avec sclérose vasculaire.

2) - UN DEUXIEME FRAGMENT ENDOMETRIAL SERT A UNE ETUDE HISTOCHIMIQUE.

L'histochemie nous a permis d'estimer subjectivement l'abondance et la localisation préférentielle de certaines substances, en particulier des enzymes. Les variations de ces derniers, provoquées par les hormones se manifestent rapidement dans le tissu-cible et leur courbe d'évolution au cours d'un cycle normal est connue avec une certaine approximation.

Selon WEGMANN et BANDKOWSKI, nous avons utilisé la technique de GOMORI (d'après LISON) à quelques artifices de détail près. Cette technique est simple : obtention facile du substrat : glycérophosphate et des réactifs de visualisation. Un seul observateur a examiné et coté subjectivement les préparations effectuées toujours par le même technicien et dans les mêmes conditions.

TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE DE MISE en évidence

de la P.A.

(WEGMANN et BANKOWSKI)

1/ - FIXATION

Le fragment d'endomètre prélevé est immédiatement plongé dans :

- a) - 1 bain d'alcool éthylique à 80 %, à + 4° C, pendant 2 heures -
- b) - 3 bains successifs de 2 heures chacun dans l'alcool éthylique à 100 % -

2/ - INCLUSION

- a) - 12 heures dans le toluène à la T° du laboratoire (20°C-)
- b) - Inclusion à la parafine liquide à 52°C, 24 heures à 50°.

3/ - COLORATION

A/ - Les Réactifs

- a) - glycérophosphate de Na 2 % (0,1 M)
- b) - véronal sodique 2 % (0,1 M)
- c) - Cl_2Ca 2 % (0,18 M)
- d) - Sulfate de Mg 2 %
- e) - nitrate de cobalt 2 %
- f) - Sulfure d'ammonium 2 %

4/ - LES SOLUTIONS

a) - Pour la Réaction

- glycérophosphate de Na 10 ml
- véronal sodique 10 ml
- Cl_2Ca 2 ml
- eau distillée 20 ml
- sulfate Mg 1 ml

b) - Pour le Témoin

La solution se prépare sans glycérophosphate.
Le pH final de la solution est de 8,6.

Technique

- Incuber les coupes dans les solutions filtrées
2 heures à 37° -
- Rincer à l'eau courante 10 mn
- Passer dans le nitrate de cobalt filtré 2 mn
- Rincer à l'eau courante 10 mn
- Passer dans le sulfure d'ammonium filtré 2 mn
- Rincer à l'eau courante 3 mn
- Monter au sirop d'Apathy ou deshydrater : alcools à
70, 95, 100 %
- Monter au baume du Canada ou résine synthétique.

Résultat

L'activité enzymatique est traduite par une coloration brun noir du sulfure de Cobalt.

- Une cotation analogue à celle utilisée dans les travaux de Monsieur MAUREL a été adoptée afin de tenter de chiffrer l'intensité et l'étendue des précipités : cotation en "+" de 0 à 4.

Nous avons retenu seulement 84 EXAMENS HISTOCHIMIQUES sur l'ensemble de nos observations. Malgré l'apport de renseignements nouveaux, nous n'avons pu, en raison d'un matériel trop réduit, représenter nos résultats par une courbe ; nous avons donc fait un graphe (plus explicite qu'un tableau-) des variations du taux histochimique de la phosphatase alcaline dans l'endomètre au cours du cycle menstruel normal

En ordonnées : Intensité de coloration en "+" de 0 à 4, considérée en valeur absolue

En abscisses : Le temps en jours, de l'instant 0 à l'instant 28, en tenant compte du facteur $t = + 1$ jour, puisque les dates indiquées sont des dates histologiques à 1 jour près.

Les colonnes du graphe représentent les moyennes arithmétiques des nombres de croix obtenues par l'addition des résultats relevés aux dates indiquées.

Nous présenterons plus loin (chapitre des résultats) deux graphes différents :

- 1 graphe pour les vaisseaux, artérioles et capillaires -
- 1 graphe pour les glandes de l'endomètre, en particulier l'épithélium glandulaire.

DE LA METHODE BIOCHIMIQUE

Un troisième fragment enfin est destiné à mesurer les taux GLOBAUX de la phosphatase alcaline et de la lactate deshydrogénase. Certes, il s'agit d'un dosage global intéressant simultanément toutes les structures de l'endomètre : glandes, vaisseaux, stroma. Mais nous venons de préciser avec l'étude histochimique menée parallèlement que ces enzymes, en particulier la phosphatase alcaline, ne pouvaient être mis en évidence qu'au niveau des glandes et des vaisseaux, au cours de leur accroissement. Cette répartition nous a paru confirmer la corrélation entre ce dosage enzymatique - pris comme exemple de synthèse protéique - et l'action des oestrogènes.

PREPARATION du prélèvement destiné à l'étude biochimique .

Le fragment d'endomètre (de 1 à 4 mg) est :

- lavé au sérum physiologique (9°/∞∞) pour éliminer sang et mucus retenus au cours du prélèvement.
- homogénéisé extemporainement dans du sucrose 0,27 M (0,8 ml) tamponné à pH 7,5 par du trihydroxyméthyl aminométhane (T.R.I.S). Cette homogénéisation se pratique avec un appareil de Potter : le fragment est refroidi : °C (glace 2 à 3 mn). On pratique de 3 à 5 "aller - retour" de piston, à 1.200 tours/mn.

L'homogénat est transporté au laboratoire dans la glace.

TECHNIQUES de laboratoire :

laboratoire d'enzymologie du Centre Hospitalo Universitaire de GRENOBLE.

Monsieur le Professeur VIGNAIS
Docteur COLOMB, Maître de Conférences agrégé

1) - Détermination de l'activité phosphatasique alcaline

Technique décrite par O.A. BESSEY et coll.
J. Biol. Chem. 1946 - 164 (321-324)

La teneur en protéines de l'homogénat est estimée par une réaction au biuret sur une partie aliquote: 0,2 ml en général.

Afin d'augmenter la perméabilité des particules subcellulaires (et pour permettre éventuellement le dosage d'enzymes particulières) on traite systématiquement le reste du prélèvement par une solution de digitonine à 0,1 %, qui doit être préparée extemporainement (1/10.000 du poids par rapport à la quantité de protéines).

Digitonine recristallisée

Eau distillée Q S P

Sucre M, QSP 0,27 M

On ajoute une solution de cholate à 4 % qui lyse les éléments subcellulaires conservés par l'homogénéisation. Une solution de sérum albumine est utilisée pour l'étalonnage.

On utilise comme substrat du paranitrophénylphosphate (P.N.P.).

Les réactifs, leur préparation

- Substrat tamponné P.N.P.
 P.N.P. 82,5 mg
 (pour analyses Prolabo)
- Glycocolle pur 187 mg
 tampon de pH 10,4
- $MgCl_2$ (activateur de la P.A))
 6 H_2O 0,5 M) 50 micro l
- Na OH 0,1 N 21 ml
 ajuster à pH 10,4 avec
 soude 0,1 N
 eau distillée QSP 50 ml
- $MgCl_2$ 0,5 M
 $MgCl_2$ 6 H_2O desséché 10,165 g
 Eau distillée QSP 100 ml
 conservation à + 4° C
- Soude 0,1 N
 Soude en pastilles 4 g
 Eau distillée QSP 100 ml
- Soude 0,02 N
 dilution 5 fois 0,1 N

Mode opératoire

	<u>Dosage</u>	<u>Blanc</u>
- Substrat tamponné ..	0,5 ml	0,5 ml
équilibrer la t° à 37 ° C		
- Homogénat	100 micro l	
10 mn à 37°C		
- Na OH 0,02 N	5 ml	5 ml
- Homogénat		100 micro l

Le paranitrophénol libéré grâce à l'action de l'enzyme est estimé par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 400 millimicrons.
lecture du dosage contre blanc.

Calcul

Le coefficient d'extinction moléculaire pour le P.N.P. est :
 $18,8 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$ à 400 millimicrons

Soit une solution P.N.P. étalon $5 \times 10^{-5} \text{ M}$
soit 50 millimicromoles/ml, densité optique 0,940

Le volume final est 5,6 ml
soit X la densité optique de 1 homogénat

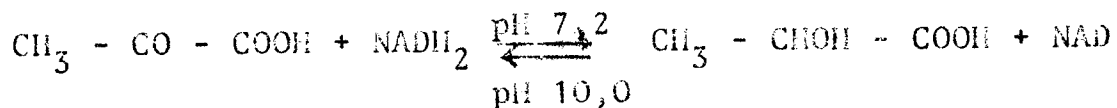
$$\frac{50 \times X \times 5,6 \times 10}{0,940 \times 10} = \text{millimicromoles de P.N.P. libérées à } 10 \text{ mn à } 37^\circ \text{ par mg de protéines.}$$

Telle est l'unité que nous avons utilisée pour chiffrer les résultats biochimiques.

2) - Détermination de l'activité L.D.H.

Rappel biochimique

w- La lactate deshydrogénase catalyse selon la réaction suivante, la transmission d'hydrogène du lactate sur un accepteur qui dans les échanges organiques intermédiaires est le plus souvent du N.A.D. (nicotinamide - adénine - dinucléotide).



l'équilibre au pH physiologique est en faveur de la formation de lactate.

Deux types de méthodes sont fréquem-
ment utilisées :

a) - Méthode des hydrazones :

CABAUD, WROBLEWSKI dosent la LDH en formant le
2,4 dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique.

b) - Méthode mettant en oeuvre les nucléotides pyridiniques

WROBLEWSKI, LA DU mesurent la consommation de NADH_2
par la diminution de la densité optique à 340 mil-
limicrons.

La LDH de l'homogénat sera donc dosée à partir de py-
ruvate et NADH_2 . On mesure au spectrophotomètre à 340 mil-
limicrons la diminution de densité optique due à l'oxyda-
tion de NADH_2 en NAD , le NADH_2 ayant un maximum d'absorp-
tion à 340 millimicrons.

Réactifs nécessaires :

- 1 - Phosphate monopotassique KH_2PO_4
- 2 - Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 3 - Pyruvate de sodium
- 4 - NADH_2 ou DPNH

Préparation des solutions :

1/ - Tampon phosphate 0,15 M - pH = 8

a) - solution phosphate disodique 0,15 M
Peser 26,860 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
eau distillée QSP 500 ml

b) - Solution phosphate monopotassique 0,15 M
Peser KH_2PO_4 10,207 g
eau distillée QSP 500 ml

Mélanger a et b de façon à obtenir un pH = 8 ;
le tampon se conserve à + 4°C.

2/ - Pyruvate de Sodium $1,65 \times 10^{-2}$ M

pyruvate de Sodium (pH = 110) 18,15 mg
tampon phosphate 0,15 M pH = 8,10 ml

Répartir les 10 ml de solution en plusieurs quantités.

Conserver au congélateur.

3/ - NADH ou DPNH - 0,015 M

NADH 26 mg

eau distillée 2 ml

se conserve à + 4° C et pendant 30 jours env.

Vérification de la molarité

1 millimicromole de DPNH \rightarrow 0,002 DO à 340 millimicrons dans 3,1 ml

Prélèvement d'homogénat

5 ml sur flacon sec

Homogénat décanté et centrifugé

10 mn à 7.000 t/mn

Prélèvement conservé au congélateur

Mode opératoire

Cuves en verre, longueur d'onde de lecture :
340 millimicrons.

température = 25° C

tampon phosphate 0,15 M ph = 8	<u>Dosage</u> 2,85 ml
DPNH 0,015 M	20 microlitres
Homogénat	100 microlitres
équilibrer à 25° C jusqu'à DO \rightarrow	constante
Pyruvate $1,65 \times 10^{-2}$ M	50 microlitres

Mélanger, faire la lecture dosage contre eau
toutes les 30 secondes pendant 5 minutes.

Calcul :

Les résultats sont exprimés en milli-unités internationales (mUI) = nombre de micromoles de DPNH transformées par mn et par ml d'homogénat.

Porter les résultats du dosage sur graphique.
En abscisse = le temps, en ordonnée = la densité
optique.

Lire la variation de DO (ΔDO) en 5 mn

Sachant que 1 millimicromole de DPNH \rightarrow 0,002 DO,
on aura :

$$\frac{\Delta DO \text{ du dosage} \times 10}{0,002 \times 5} = \text{millimicromole d'homogénat}$$

transformées par mn et ml d'homogénat, soit en
mUI :

$$\Delta DO \text{ du dosage} \times 1.000 = \text{mUI en 5 mn}$$

Valeurs normales :

42 à 84 mUI (adultes) : laboratoire de

Monsieur le Professeur VIGNAIS

- REFERENCES
PRINCIPALES
- (KING J. - Practical Chemical Enzymology - 1965, page 83
 - (BERGMAYER H.V. - Methods of Enzymatic Analysis
 - (1965, pages 651 et 736
 - (COLOWICK S., KAPLAN : Methods in Enzymology
 - (Vol. 1, page 441

3°) Technique de séparation électrophorétique
des isoenzymes de la L.D.H.

- Tirée de la méthode de WIEME à partir de la technique originale de VAN DER HELMS au N.B.T.
- Modifiée selon la technique de R.C. NYLERS et H. VAN REMONTEL.

Préparation des Isoenzymes

Tampon de migration

- 1) - Tampon Véronal pH 8,6
 - Véronal acide 2,76 g
 - Véronal sodé 15,4 g
 - Eau distillée QSP 1 l
- 2) - Tampon TRIS - HCl pH 8,3
 - Tris base 24,1 g
 - HCl pH 8,3
 - eau distillée QSP 1 l
- 3) - Tampon Tris véronal pH = 8,4

Mélanger les tampons 1) et 2) volume à volume

- 4) - Ajouter de la sérum-albumine à raison de 1 g/litre

Préparation de l'électrophorèse

- Bandes d'acétate de cellulose

- Tremper les bandes dans le tampon 3)
- Essorer entre 2 feuilles de papier Whatman n° 1 -
- Suspendre les bandes entre 2 plaques de verre espacées (veiller à ce que les bandes soient bien tendues).
- Déposer de 2 à 5 microlitres d'homogénat (pipette Carlsberg) à 2/3 de l'extrémité (+)

-Cuve d'électrophorèse

- Verser le tampon 3) dans les couloirs latéraux de la cuve Shandon.
- Placer une bande de papier Whatman n° 1 sur les ponts destinés à supporter les bandes d'électrophorèse -
- Placer les bandes sur ces ponts -
- Fermer le couvercle -
- Placer la cuve dans l'enceinte réfrigérée à + 4°C - Brancher les électrodes en mettant le pôle (+) du côté du champ de migration le plus long.

Faire passer le courant : 3 à 4 mA par bande (= 180 à 250 volts) -

Migration pendant 1 H. 30 à + 4°C.

Couper le courant avant de retirer les bandes -

Après chaque migration, intervertir les polarités ou mélanger le tampon.

Préparation du milieu de révélation

Algarose	1,5 g	1,07 g	0,75 g
Tris H Cl 0,2 M, pH 8,3	70 ml	50 ml	35 ml

Dissoudre en chauffant au bain-marie bouillant - Refroidir à 60° C.

Ajouter dans l'ordre, en agitant circulairement :

- Lactate 60 % : 2 ml	1,43 ml	1 ml
- N B T 1 mg/ml: 20 ml	14,3 ml	10 ml
- P H S 1 mg/ml: 1 ml	0,72 ml	0,5 ml
- N A D : 10 mg/6 ml	70 mg/4,2 ml	50 mg/3 ml

NBT - PHS - NAD doivent être préparés extemporainement et laisser à l'obscurité.

Mélanger et couler dans une boîte de Pétri à l'obscurité - Eliminer les bulles, laisser prendre en masse.

Révélation

- Retourner les bandes d'acétate sur la gélose.
- Passer sur les bandes un agitateur, en roulant pour chasser les bulles d'air.
- Laisser 30 minutes à l'obscurité à 37° C -
- Retirer les bandes - les laisser 5 mn dans HNO₃ 3 % pour fixer la coloration -
- Bien rincer à l'eau distillée -
- Laisser sécher complètement -
- Passer les bandes à l'enregistreur Vitatron du pôle (+) au pôle (-) à 583 millimicrons.
- Calculer le pourcentage de chaque fraction par triangulation -

REFERENCES
PRINCIPALES

- (- R.C. MEYERS and H. VAN REMONTEL
- (The use of a reagent gel to locate lac-
- (tate deshydrogenase isoenzyme separated
- (on cellulose acetate membrane
- (Clin. Chem. Vol. 14 n° 11
- (1968, p. 113 1
- (- BARNETT H: Electrophoretic separation of
- (LDH isoenzyme on cellulose acetate ;
- (Biochem. J. (1962) pages 83-84
- (The staining of LDH isoenzyme
- (after électrophoretic separation on cel-
- (lulose acetate.
- (J. Clin. Path. (1964) 17 - 567

AINSI DE CE RAPIDE
SURVOL DES METHODES HISTOLOGIQUES,
HISTOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES, RES-
SORT L'INTERET EVIDENT, QUE NOUS NOUS
ATTACHONS A SOULIGNER, D'UNE COLLABO-
RATION ETROITE ENTRE L'ANATOMOPATHO-
LOGISTE, LE BIOCHIMISTE ET LE GYNECO-
LOGUE.

Première Partie

LA PHOSPHATASE ALCALINE

Complément et précision de recherches antérieures

Nous ne reprenons pas les différents problèmes théoriques de l'étude de la phosphatase alcaline, ni les discussions multiples concernant la présence de la phosphatase alcaline dans l'endomètre, sa distribution,, ses variations au cours du cycle menstruel et ses fonctions dans ce tissu.

Nous nous contenterons de préciser les résultats obtenus par Monsieur HAUREL en 1968. Pour cette étude, nous ne tiendrons compte que de la date histologique des prélèvements.

1) - Les résultats HISTOCHIMIQUES

Ils nous ont permis d'acquérir ce qui suit :

a) - Le taux histochimique de la phosphatase alcaline atteint dans les vaisseaux de l'endomètre :

- Un premier maximum préovulatoire entre le 11^e et le 12^e jour du cycle -
- Un deuxième maximum qui se situerait vers la période de pleine activité du corps jaune, c'est-à-dire vers le 21^e - 23^e jour.

Cette donnée a été mise en évidence par un nombre plus élevé d'observations.
(84 au lieu de 44).

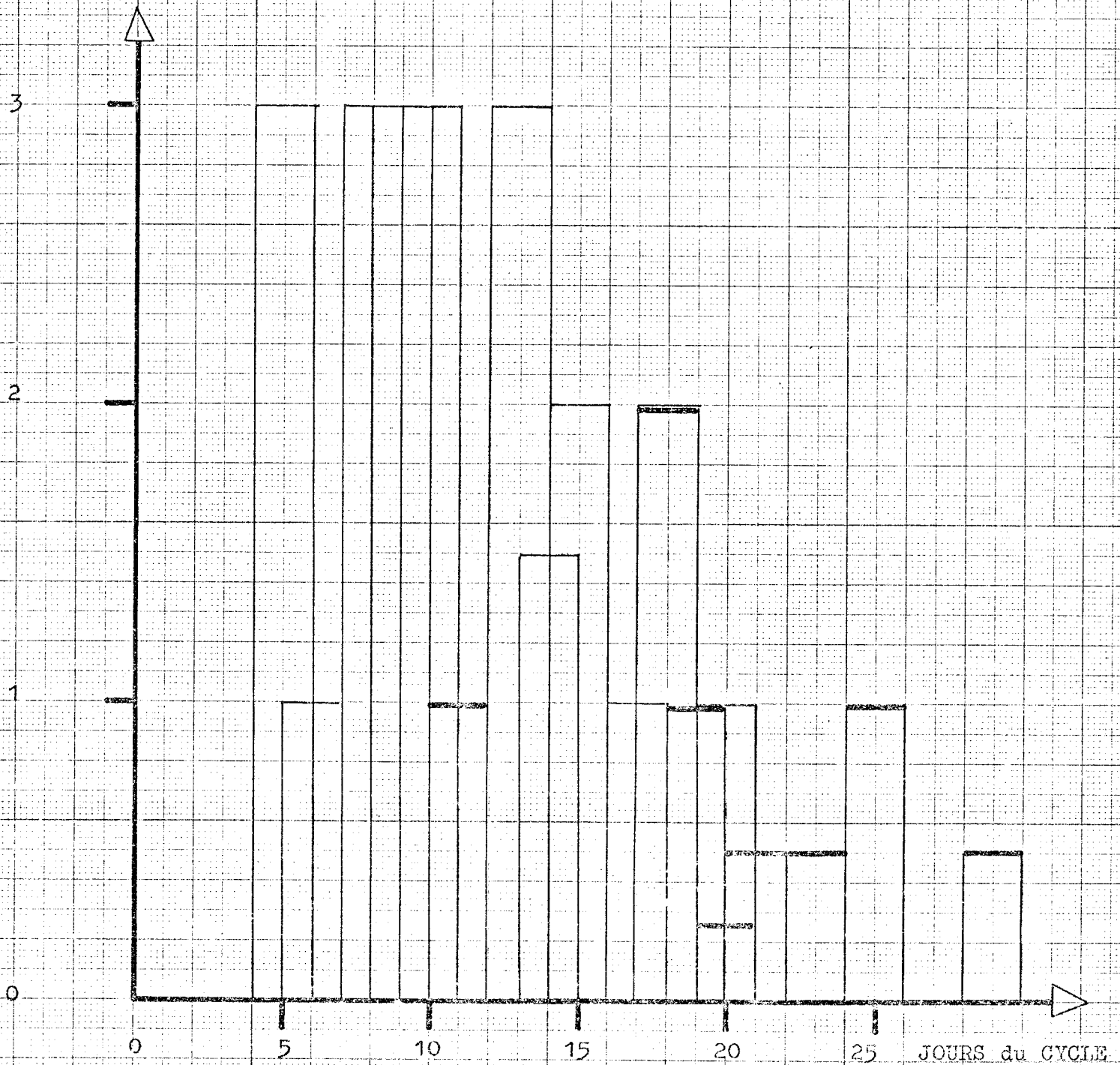
b) - Dans les glandes, un maximum à la même période préovulatoire, puis une décroissance rapide.

Dans les deux localisations qui ont fait l'objet de notre étude, l'apparition des règles (arrêt brutal de la sécrétion oestrogénique) coïncide avec la disparition de la phosphatase alcaline. Son activité reprend avant la fin des règles.

L'utilisation de la technique de comparaison avec des standards laisse une grande place à l'élément subjectif. Cependant, à la suite de nos constatations nous retenons une évolution parallèle entre les modifications du taux de la phosphatase alcaline endométriale et l'activité des oestrogènes au niveau tissulaire, évolution constatée grâce aux variations classiques de l'aspect histologique de l'endomètre

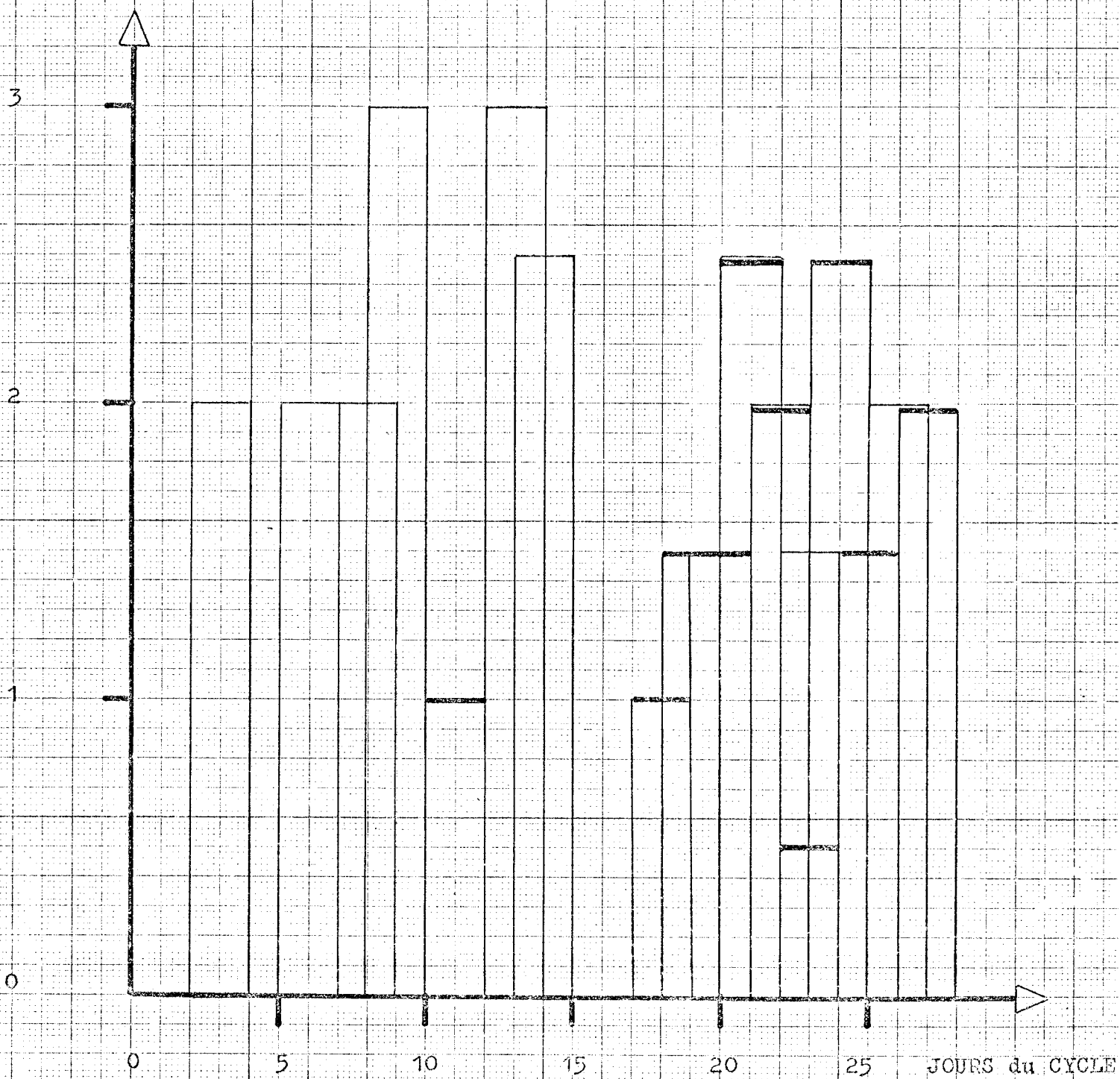
VARIATIONS DU TAUX HISTOCHIMIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES GLANDES DE L'ENDOMETRE

Taux histochimique de PHOSPHATASE ALCALINE exprimé en (+)



VARIATIONS DU TAUX HISTOCHIMIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCAINE DANS LES VAISSEaux DE L'ENDOMETRE

Taux histochimique de PHOSPHATASE ALCAINE exprimé en (+)



PHOSPHATASE ALCALINE

PAGE 1

LISTE DES 154 POINTS EXPERIMENTAUX

DATE HISTO- LOGIQUE	TAUX	SUJETS
1.0	28.0	N ARS
1.0	70.0	BUI
1.0	73.0	Y ARS
1.0	74.0	SOL
1.0	122.0	VIN
1.0	303.0	SAN
1.0	535.0	BAC
2.0	55.3	N BAL
2.0	96.0	N VEY
3.0	54.0	RIC
3.0	96.0	VEY
3.0	165.0	GAU
3.0	318.0	N RIC
5.0	313.0	N SET
5.0	314.0	SET
6.0	63.0	N DAT
6.0	90.0	R CDC
7.0	290.0	N ACH
7.5	372.0	NIC
8.0	19.9	N LEV
8.0	328.0	N PIA
8.0	674.0	HER
9.0	20.0	LEV
9.0	35.0	LET
9.0	138.0	N SAL
9.0	147.0	LAL
9.0	177.4	N DUB
9.5	147.0	LAL
9.5	383.0	N LCF
10.0	121.0	R SET
10.0	125.0	RIC
10.0	229.0	CDC
10.0	318.1	N RIC
10.0	355.0	CDC
10.0	444.0	N RAJ
11.0	284.0	R DYO
11.0	540.0	BRE

AGE HISTO- LOGIQUE	TAUX	SUJETS
11.5	166.0	BLA
12.0	791.0	R MAO
13.0	189.0	N ABO
14.0	228.0	N DUB
14.0	272.0	BEN
14.0	587.0	R MAO
15.0	140.0	N VER
15.0	564.0	VER
16.0	266.0	AGU
16.0	294.7	N LEV
16.0	713.0	MIS
16.5	65.0	R PAD
17.0	510.0	BAI
17.0	515.0	FEV
17.0	600.0	MOU
17.0	713.0	N MIS
18.0	49.0	LEG
18.0	81.0	COU
18.0	193.0	N SAL
18.0	270.0	GRA
18.0	323.3	R JUN
18.0	358.0	RIC
18.0	453.0	N AYA
18.0	587.0	R MAG
18.0	784.6	N YOU
18.0	830.0	REP
18.0	850.0	BOU
18.0	860.0	KAM
18.0	980.0	ERL
18.0	980.0	BAR
18.0	1370.0	GUE
18.0	2120.0	REY
18.5	286.0	TIM
18.5	331.6	R TOU
19.0	286.0	TOM
19.0	450.0	TOU
19.0	1814.0	NOY
19.5	97.0	SER

DATE HISTO-
LOGIQUE

TAUX

SUJETS

20.0	67.0	MOU
20.0	89.0	CIC
20.0	97.0	SER
20.0	147.0	CAR
20.0	193.0	SOL
20.0	413.0	MEU
20.0	597.0	MEU
20.0	765.0	ADB
20.0	868.0	MEN
20.0	1441.0	BAR
20.5	43.0	CAR
20.5	63.9	R BER
20.5	67.0	MOU
20.5	153.3	N SAE
21.0	36.0	RIV
21.0	43.0	CAR
21.0	49.0	GUY
21.0	76.0	CEZ
21.0	77.0	CAR
21.0	110.0	VER
21.0	122.0	SAN
21.0	210.0	VIN
21.0	217.9	R AMI
21.0	221.0	R LAR
21.0	262.0	ROU
21.0	350.0	CEC
21.0	352.4	N ESP
21.0	360.0	CAR
21.0	430.0	SAU
21.0	507.0	R LEV
21.0	980.0	BAR
21.5	36.0	RIV
21.5	57.5	GOB
22.0	18.9	N KHA
22.0	45.3	N DUB
22.0	57.0	FBI
22.0	84.0	BER
22.0	132.0	MAS
22.0	139.0	R PER
22.0	440.0	TRE
22.5	61.4	R BLA
22.5	74.1	R POD
22.5	230.0	VED

ATE HISTO-
LOGIQUE

TAUX

SUJETS

23.0	17.0	BEN
23.0	61.0	BLA
23.0	66.0	FAR
23.0	82.0	N GUS
23.0	106.0	FAV
23.0	145.0	N VAU
23.5	90.0	BEN
23.5	99.0	DIS
24.0	51.0	CHI
24.0	56.0	DIT
24.0	60.0	PER
24.0	67.0	GUE
24.0	114.0	AUT
24.0	202.0	REV
24.5	67.0	GUE
25.0	60.8	N BUI
25.0	97.0	BEU
25.0	123.0	CAR
25.0	144.0	GEI
25.0	148.0	RUS
25.0	149.0	RIC
25.0	224.0	PEY
25.0	451.0	N GIR
26.0	42.3	R VER
26.0	60.0	MEI
26.0	76.0	ROC
26.0	105.0	PAP
26.0	126.0	N MIN
26.0	128.0	ALL
26.0	153.0	SAE
26.0	268.0	COL
27.0	234.0	CON
27.0	254.0	SUR
27.0	440.0	JUL
28.0	185.0	BEN
28.0	566.0	BAR

2) - Le dosage de l'activité PHOSPHATASIQUE

Nous avons vu dans la présentation des méthodes que la phosphatase alcaline hydrolyse le P.N.P. en paranitrophénol et phosphate, à pH 10,4.

Le P.N.P. est incolore en milieu alcalin alors que le paranitrophénol est jaune. L'action de l'enzyme est stoppée par addition de soude concentrée.

Par spectrophotométrie on mesure l'intensité de coloration à la longueur d'onde 400 millimicrons.

L'instabilité du P.N.P. constitue un des inconvénients de la méthode. On utilise donc un substrat de préparation récente dont la valeur est vérifiée au spectrophotographe à 400 millimicrons.

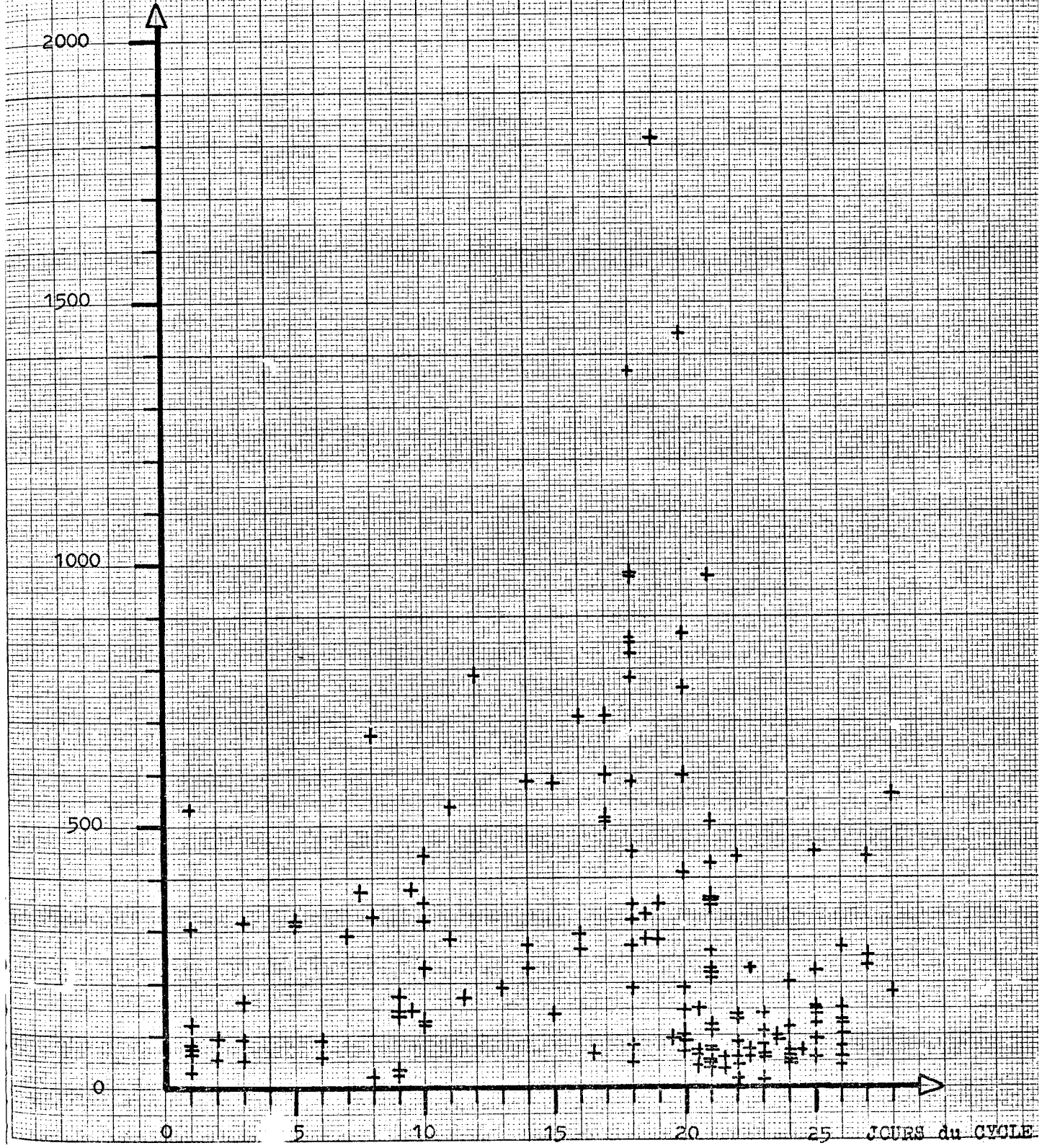
PHOSPHATASE ALCALINE

GRAPHE DES

Taux de PHOSPHATASE ALCALINE au niveau de l'endomètre exprimé en millimicromoles de paranitrophénolphosphate en 10' à 37° par mg de protéine .

154 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n° 1



NOS RESULTATS

RAPPEL DES CALCULS ANTERIEURS

Les calculs antérieurs, contenus dans la thèse de Monsieur C. MAUREL avaient pour objet l'étude de la variation moyenne au long du cycle menstruel théorique de 28 jours, du taux de phosphatase alcaline exprimé en millimicromoles de paranitrophénolphosphate, en 10 mn, à 37° par mg de protéine.

Ils avaient été programmés par Monsieur E. SIBUT en langage ALGOL sur l'ordinateur I.B.M. 7044 du Laboratoire de Mathématiques Appliquées de l'Université de Grenoble sous la direction de Monsieur le Professeur agrégé GASTINEL, Directeur du Laboratoire.

Au cours de six mois de programmation de nombreux essais en machine impliquant des méthodes mathématiques relativement élaborées : séries de Fourier, statistique, etc .. avaient été réalisés.

En fonction du nombre croissant des prélèvements et par là-même du nombre de points expérimentaux, on constatait, au vu de leur graphe, que la dispersion des mesures augmentait. Si bien que l'on devait sans cesse opter pour de nouveaux schémas de calcul de plus en plus simples.

Sur les 106 biopsies réalisées, 54 observations avaient été retenues pour les calculs publiés : (Il n'a été fait aucune distinction entre les cycles normaux et les retards maturatifs).

Au vu du graphe de ces 54 points, il était permis de supposer que l'allure générale du phénomène étudié pouvait être représenté ainsi :

1) - Une droite passant par l'origine des axes et ce jusqu'à une certaine date T -

2) - Une parabole depuis cette même date T jusqu'au 28^e jour du cycle, parabole passant par le point de coordonnées $(28,0)$ et ayant en ce point une tangente horizontale (dérivée nulle).

Le critère d'approximation choisi pour faire ces deux ajustements était celui des moindres carrés.

Des essais avaient été effectués pour des valeurs entières de T allant de 11 à 22. Parmi l'ensemble de ces valeurs nous avons retenu comme résultat final, celles qui rendaient minimale la somme des carrés des écarts et donnaient le meilleur raccordement entre la droite et la parabole.

Un graphe pour $T = 18$ représentant la droite dans l'intervalle $(0, T)$, la parabole dans l'intervalle $(T, 28)$ avait été reproduit ainsi que celui représentant la somme des carrés des écarts en fonction de T .

Les dates repérées histologiquement étaient connues à un jour près et parfois à une demi-journée.

Les taux mesurés étaient exprimés avec une précision de 10 % environ. Les erreurs systématiques et accidentelles liées inévitablement à chaque mesure ne permettaient pas d'expliquer à elles seules cependant la très grande dispersion des observations. Bien que l'estimation de l'activité phosphatasique soit beaucoup plus sensible que la détermination du taux de protéines, il est évident que pour les prélèvements peu abondants, l'expression des résultats peut être faussée.

Nous avons également attribué cette dispersion au fait que les biopsies étaient réalisées sur des sujets distincts, le plus souvent avec une seule mesure par sujet.

Les moindres carrés

Le critère des moindres carrés est celui choisi pratiquement pour l'ensemble des travaux et il nous a semblé bon de le rappeler.

Soit un certain phénomène à étudier et un ensemble de N mesures s'y rapportant.

Soient $t_1, t_2, \dots, t_i, \dots, t_N$ les N abscisses

Soient $Y_1, Y_2, \dots, Y_i, \dots, Y_N$ les N ordonnées

Dans les travaux précédemment rappelés :

- N a la valeur 54
- les t_i représentent les dates repérées histologiquement à un jour près.
- les Y_i représentent les taux de phosphatases mesurés à 10 %.

Soit une famille de courbes dépendant

de la variable t ,
de M paramètres $a_1, \dots, a_j, \dots, a_m$

de

et ayant pour expression analytique :

$$y = f(a_1, \dots, a_j, t)$$

L'approximation au sens des moindres carrés consiste à déterminer les valeurs numériques de ces M paramètres rendant minimale la quantité Q , somme des carrés des écarts entre chaque mesure y_i et la valeur

$$y_i = f(a_1, \dots, a_j, t_i)$$
 de la fonction représentant

le phénomène étudié en cette même abscisse t_i .

$$\text{On a } Q = \sum_{i=1}^{i=N} (Y_i - y_i)^2$$

Exemples :

1) - Si la famille de courbes choisies est une famille de droites :

M est égal à 2 et $f(a_1, a_2, t)$ s'écrit $a_1 xt + a_2$

Mais réciproquement, le fait que M soit égal à 2 n'implique pas que la famille de courbes soit une famille de droites.

Quand on impose à cette famille de droites de passer par un point donné elle ne dépend plus que d'un seul paramètre. Si le point considéré est l'origine des axes, alors M vaut 1 et $f(a_1, t)$ s'écrit $a_1 xt$.

2) - Lorsque les courbes choisies sont des paraboles ayant un axe parallèle à la direction des ordonnées M à la valeur 3 et $f(a_1, a_2, a_3, t)$ s'écrit :

$$a_1 x t^2 + a_2 T + a_3$$

Mais réciproquement, le fait que M soit égal à 3 n'implique pas que la famille de courbes soit une famille de paraboles.

Quand on impose une contrainte :
que la famille de paraboles passe par un point donné par
exemple, M vaut alors 2.

Quand en plus on impose une seconde contrainte :
avoir une pente donnée en ce même point, par exemple,
 M vaut 1.

La détermination pratique des valeurs
de ces M paramètres est obtenue en dérivant la quantité Q
partiellement par rapport à chaque paramètre a_j .

Le fait d'annuler les M dérivées ainsi obtenues
exprime que la quantité Q est minimale par rapport aux a_j
et fournit un système de M équations linéaires à M incon-
nues.

Actuellement, des procédés parfaitement au point permet-
tent la résolution pratique de ce genre d'équations.

Le choix de la famille de courbes et celui de M
(s'il n'est pas fixé par le choix précédent) repose sur
deux critères :

- 1) - La connaissance partielle du phénomène étudié -
- 2) - L'allure générale du graphe des points expérimentaux.

Les premiers calculs étant faits, on obtient des pré-
cisions sur la famille de courbes choisies et les valeurs
de n à essayer.

On est parfois obligé de séparer l'intervalle de
ti en plusieurs sous-intervalles - ce fut notre cas :

1er intervalle 0 - T

2e intervalle T - 28

et de choisir une famille de courbes différentes dans cha-
cun d'eux : dans le 1er une famille de droites, dans le 2e
une famille de paraboles.

D'autres critères d'approximation que celui des moindres carrés existent : le critère des moindres écarts par exemple, cependant les moindres carrés sont d'un emploi classique et relativement sûr.

REPRISE DE L'ANCIEN SCHEMA
DE CALCUL

"droite - parabole"

En un premier temps, il a fallu réécrire le programme "droite - parabole" de la thèse précédente de façon à en permettre l'exécution sur la machine actuelle : un ordinateur I B M de la série 360 modèle 67.

Appliqué aux 54 points initiaux, ce programme a donné des résultats identiques aux résultats antérieurs avec une précision du 1/ 10.000. Cette différence est due au fait que la longueur d'un mot machine est de 32 positions binaires (32 bits) sur la série I B M 360 alors qu'elle est de 36 bits sur l'I B M 7044.

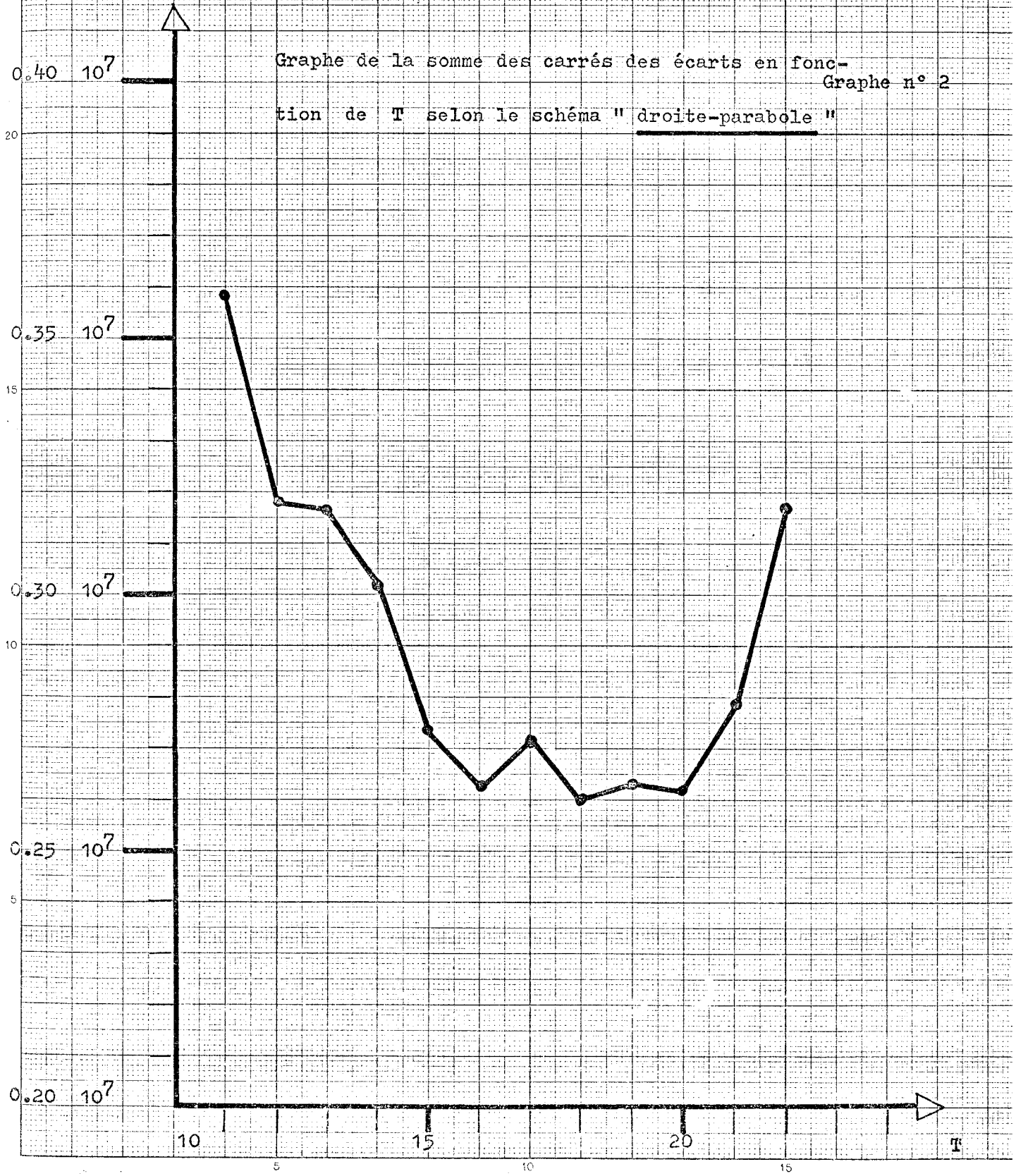
Avec ce nouveau programme trois séries de calculs ont été réalisées :

- la série 1 avec 84 points
- la série 2 avec 123 points
- la série 3 avec 154 points finalement retenus et portés sur le graphe n°1.

PHOSPHATASE ALCAINE 84 POINTS

SOMME DES CARRÉS DES ÉCARTS

Graphe de la somme des carrés des écarts en fonction de T selon le schéma "droite-parabole"
Graphe n° 2

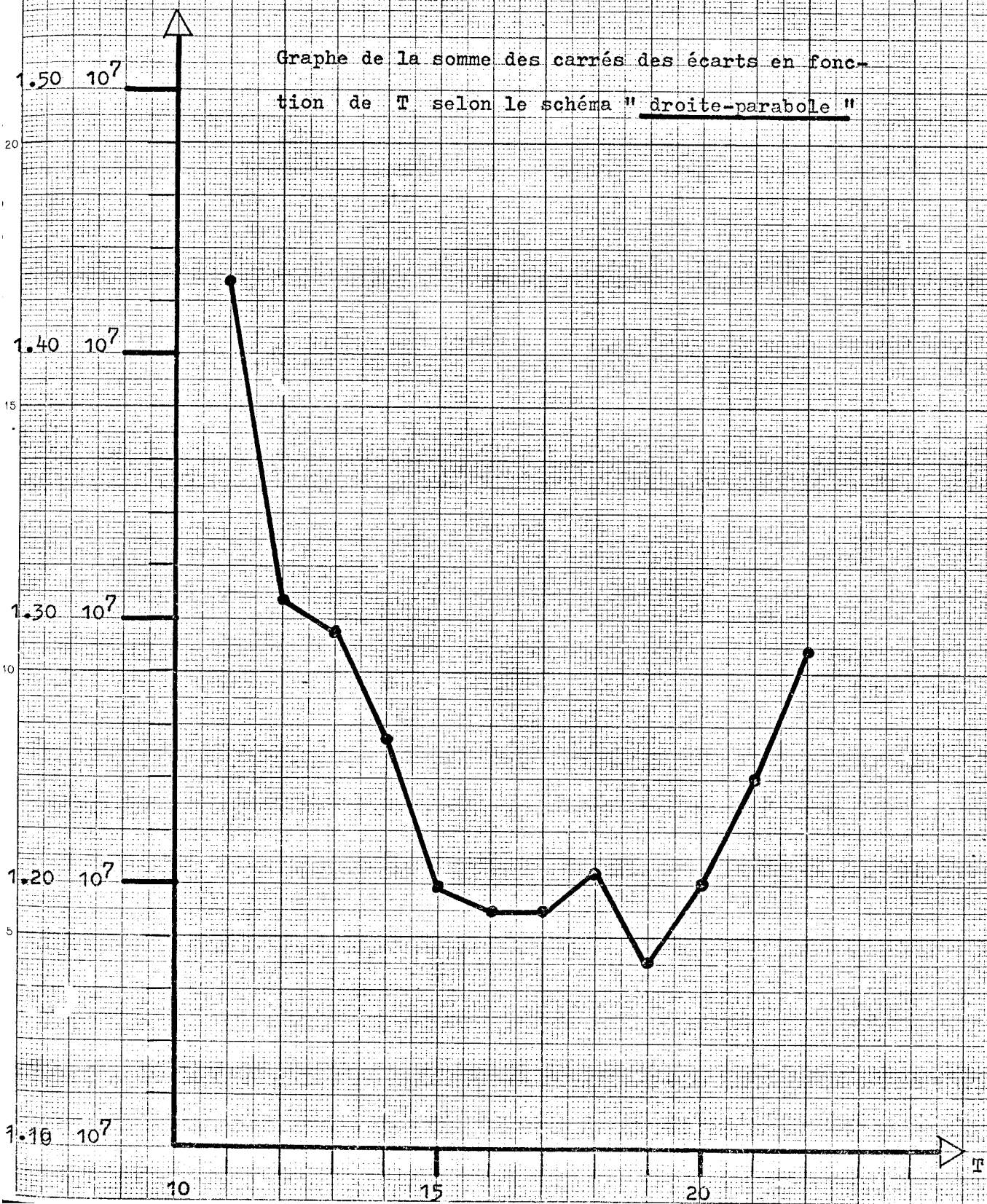


PHOSPHATASE ALCALINE 1 2 3 POINTS

SOMME DES CARRÉS DES ECARTS

Graphe n° 3

Graphe de la somme des carrés des écarts en fonction de T selon le schéma " droite-parabole "

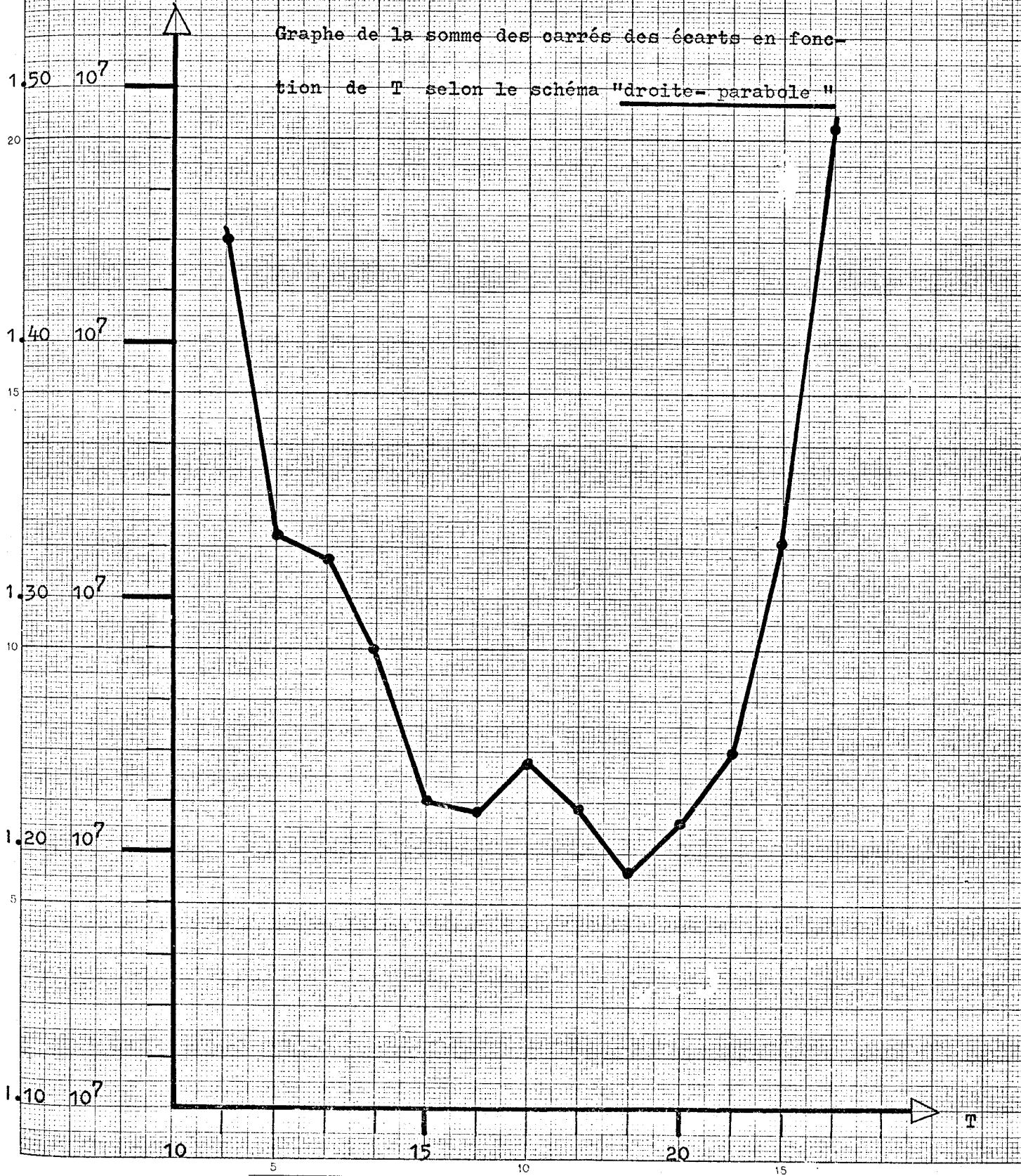


PHOSPHATASE ALCAINE 1.54 POINTS

SOMME DES CARRÉS DES ECARTS

GRAPHE n° 4

Graphes de la somme des carrés des écarts en fonction de T selon le schéma "droite-parabole"



PHOSPHATASE ALCALINE

SOLUTION OBTENUE PAR LE SCHEMA DE CALCUL

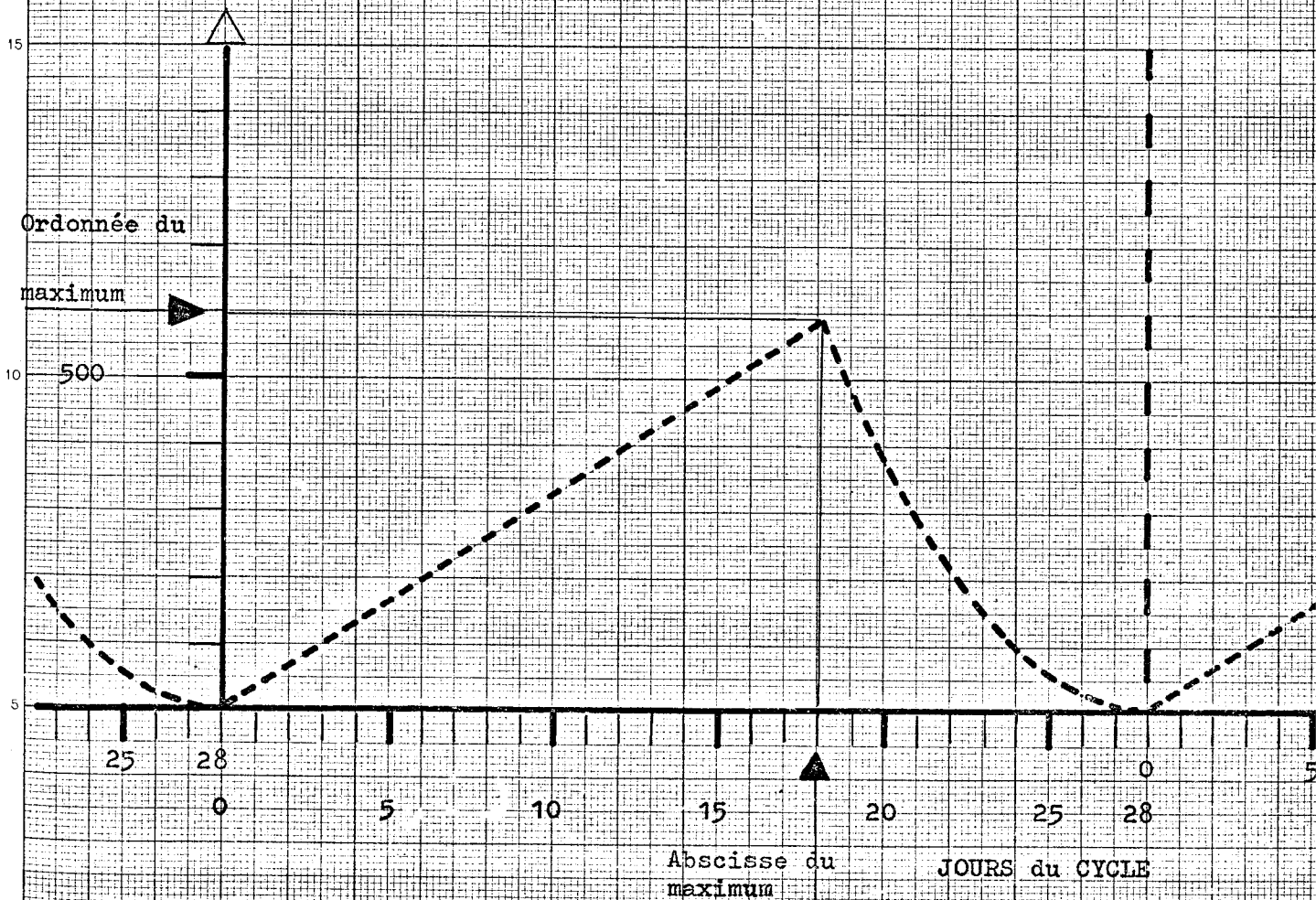
UTILISE DANS LA THESE DE M^r C. MAUREL

" droite-parabole "

154 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n°5

Taux de PHOSPHATASE ALCALINE au niveau
de l'endomètre exprimé en millimicromoles
de paranitrophénolphosphate en 10' à 37°
par mg de protéine .



Les graphes n° 2, 3, 4 sont la représentation de la somme des carrés des écarts en fonction de T pour chacune des 3 séries de calcul.

L'allure générale de ces lignes brisées est très semblable. Cependant le "creux" de ces courbes ne va pas en se resserrant lorsque le nombre de points augmente :

- Pour la série 1, il se situe entre le 16e et le 20e jour,
- mais pour les séries 2 et 3, il se trouve entre le 15e et le 20e jour.

Le "pic" qui est dans cette zone va en s'accroissant au lieu de disparaître lorsqu'on passe de la série 1 à la série 2, puis à la série 3.

Cela montre que ce schéma de calcul "droite - parabole" qui a permis d'obtenir la solution portée sur le graphe n° 5 avec l'ensemble des 154 points doit être repensé. Bien que raisonnable à priori et justifié par les calculs faits avec les 54 points de la thèse précédente, il n'est pas satisfaisant actuellement malgré un nombre triple de mesures.

NOUVEAU SCHEMA DE CALCUL

"parabole - parabole"

Nous avons gardé le principe qui consiste à partager le cycle en deux sous-intervalles par la date T :

- 1er sous-intervalle : (0 ; T)
- 2e sous-intervalle : (T ; 28)

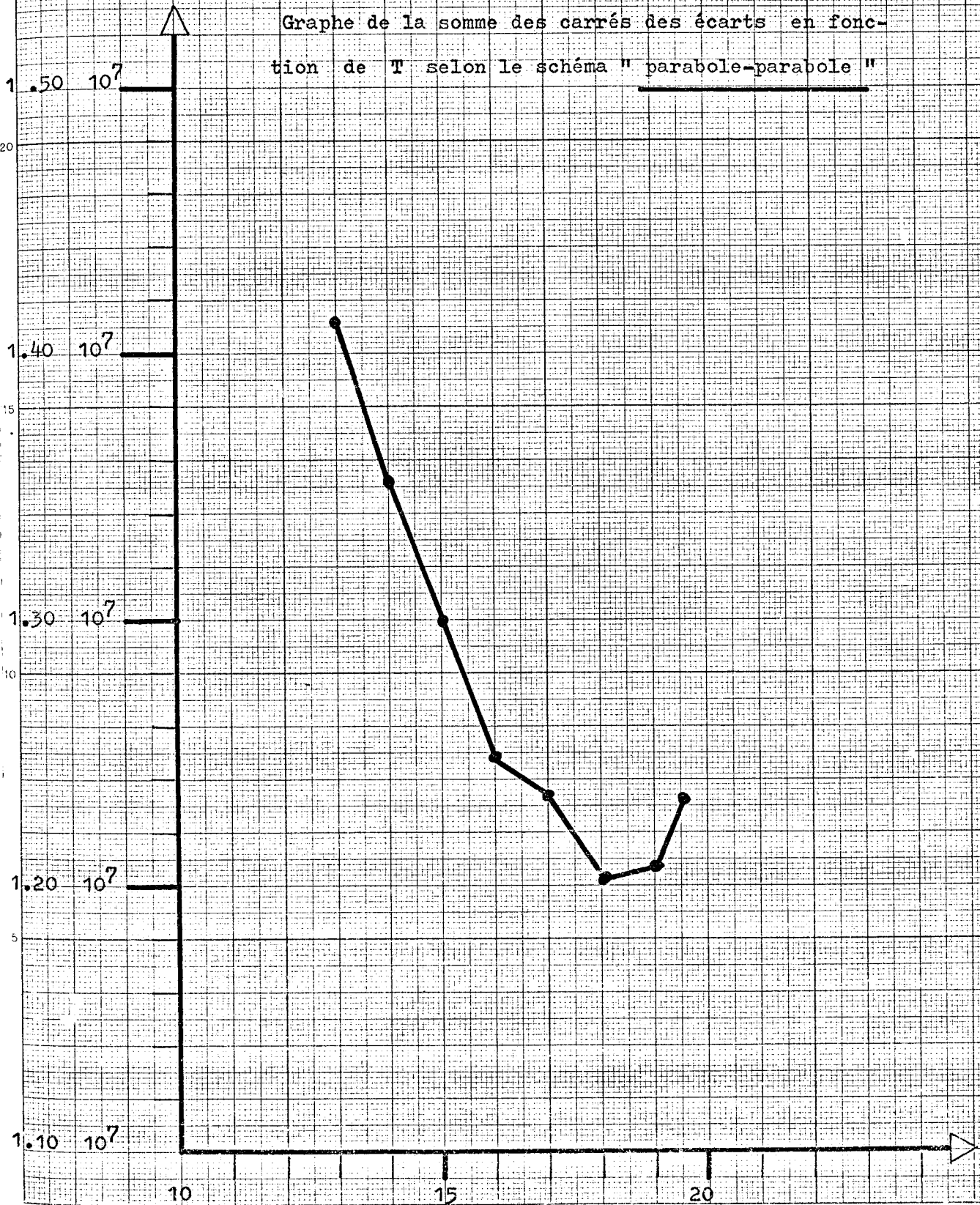
Dans chacun d'eux nous faisons une approximation au sens des moindres carrés par une famille de paraboles à laquelle nous n'imposons aucune contrainte.

PHOSPHATASE ALCALINE 1 5 4 POINTS

SOMME DES CARRÉS DES ECARTS

Graphe n° 6

Graphe de la somme des carrés des écarts en fonction de T selon le schéma "parabole-parabole"

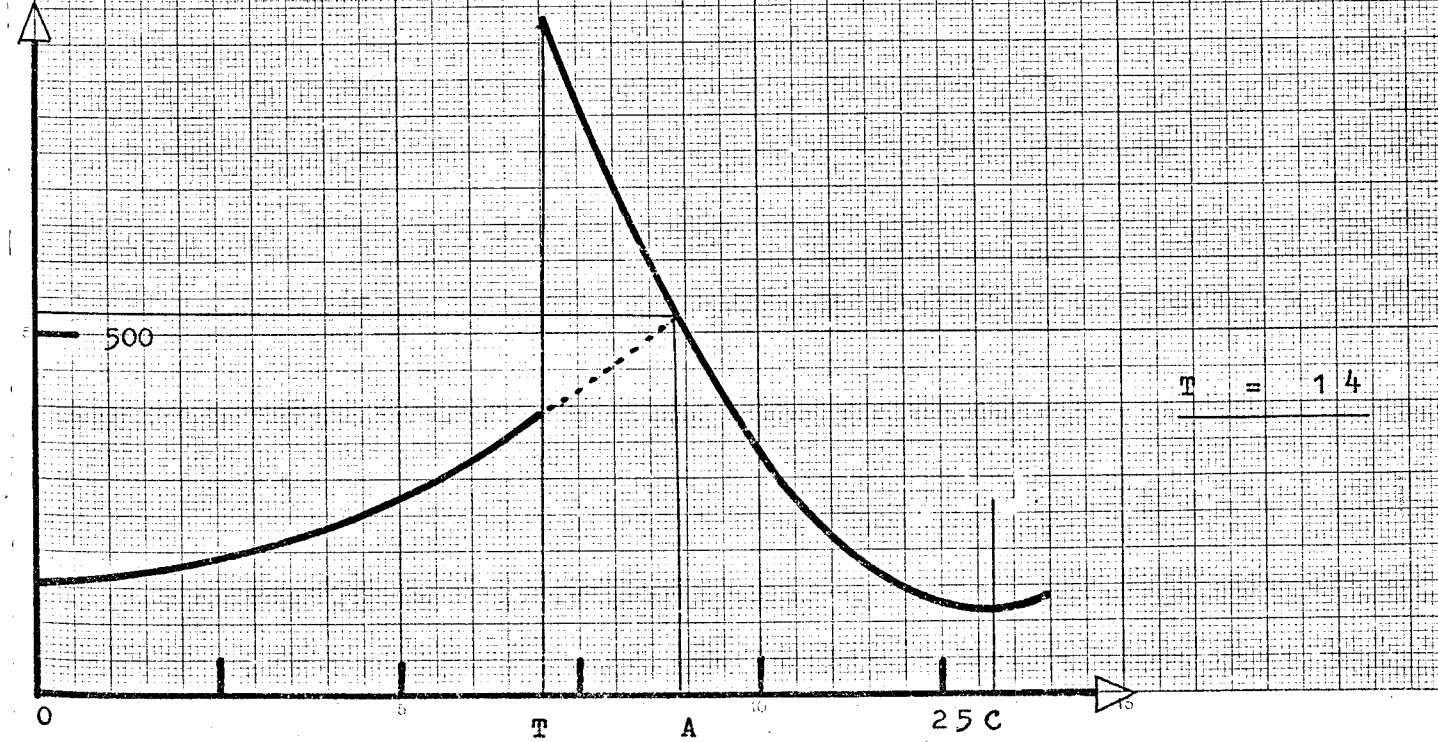
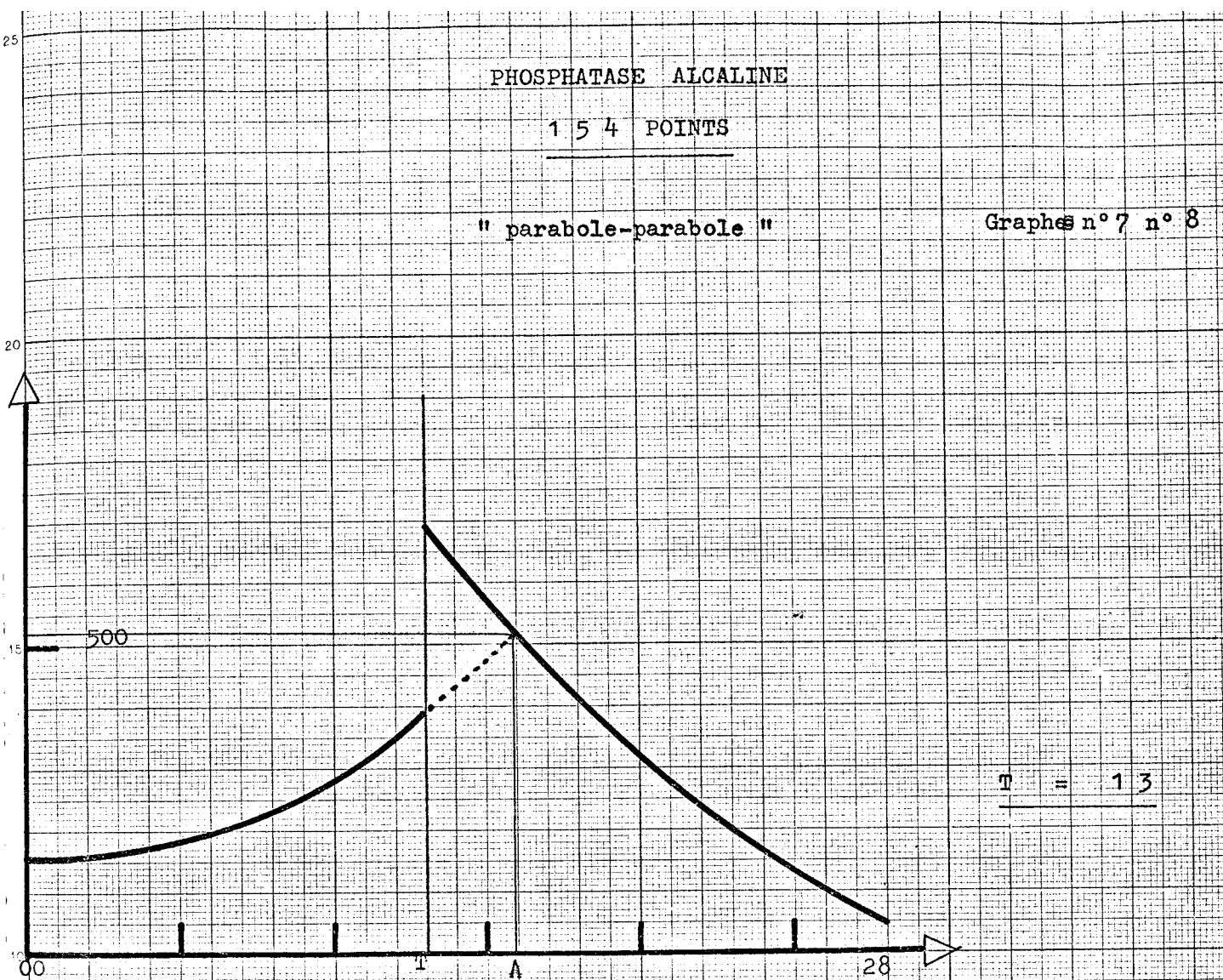


PHOSPHATASE ALCALINE

1 5 4 POINTS

" parabole-parabole "

Graphes n° 7 n° 8

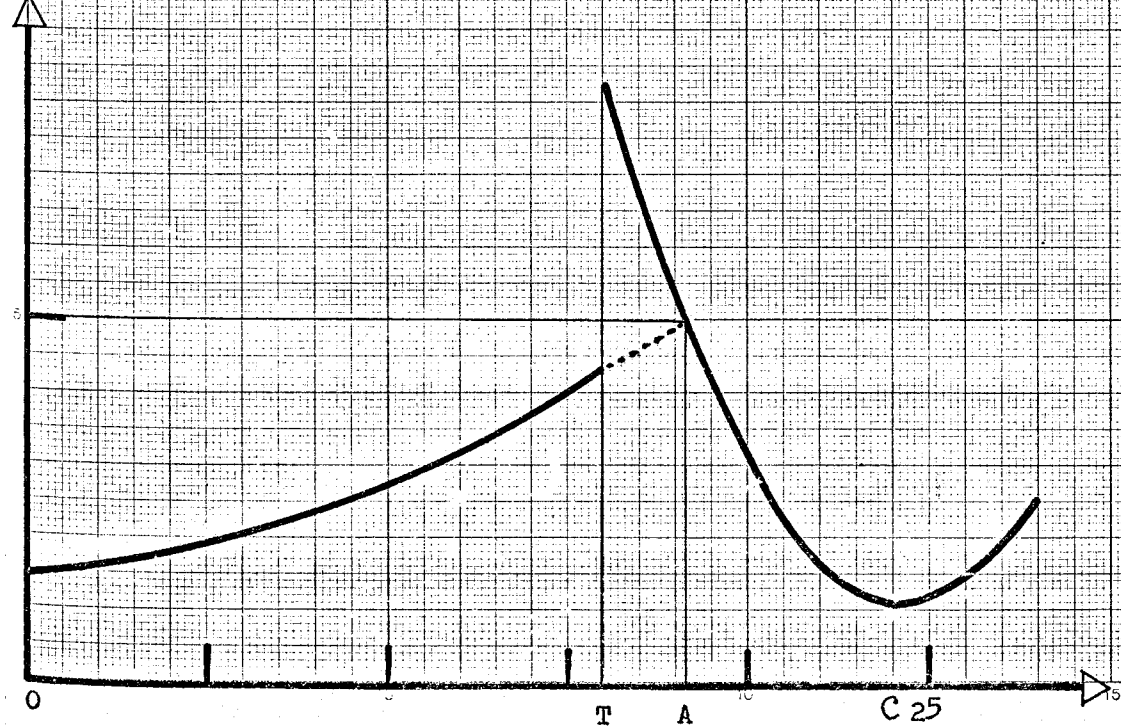
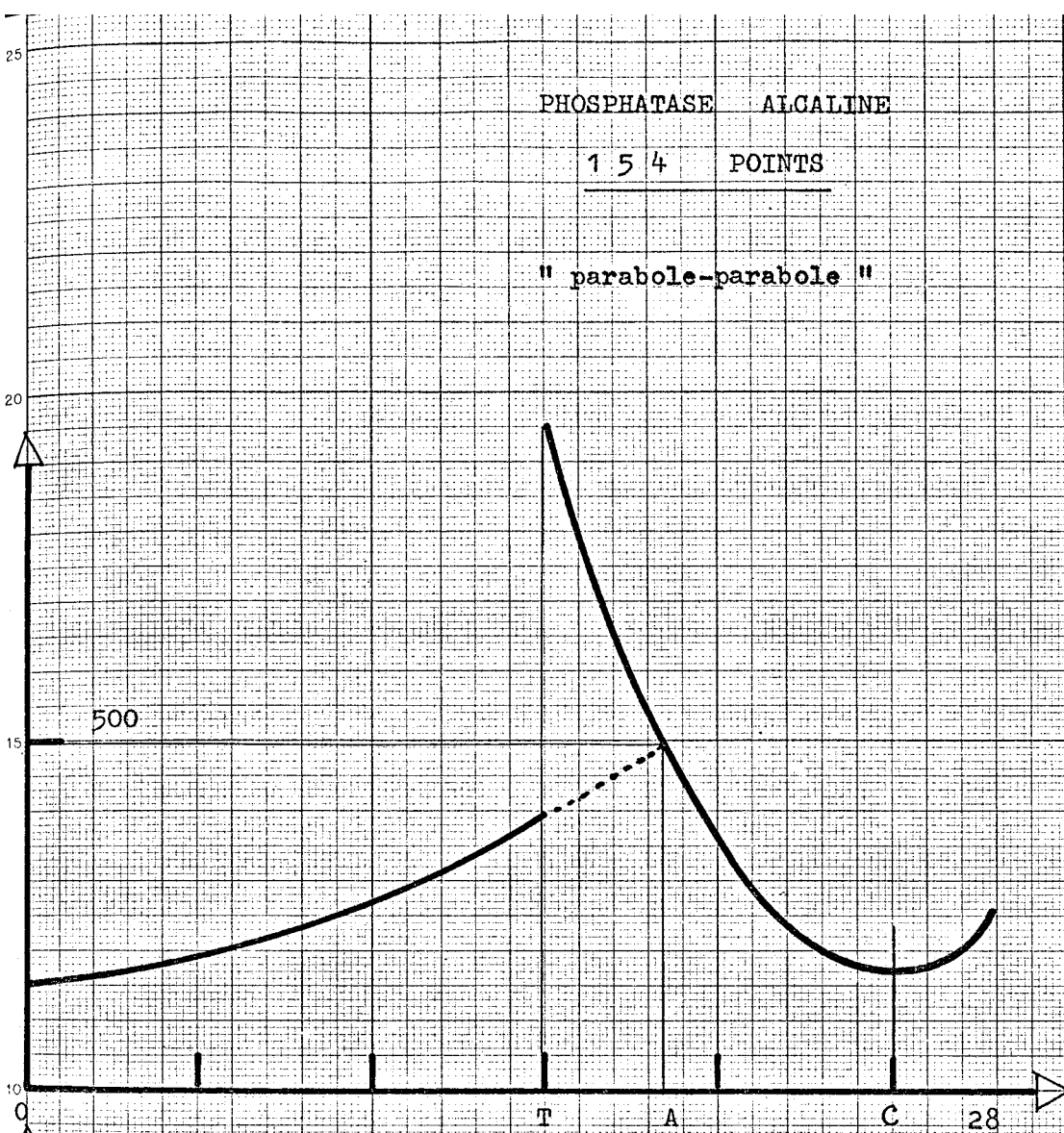


PHOSPHATASE ALCALINE

1 5 4 POINTS

" parabole-parabole "

Graphes n° 9 n° 10

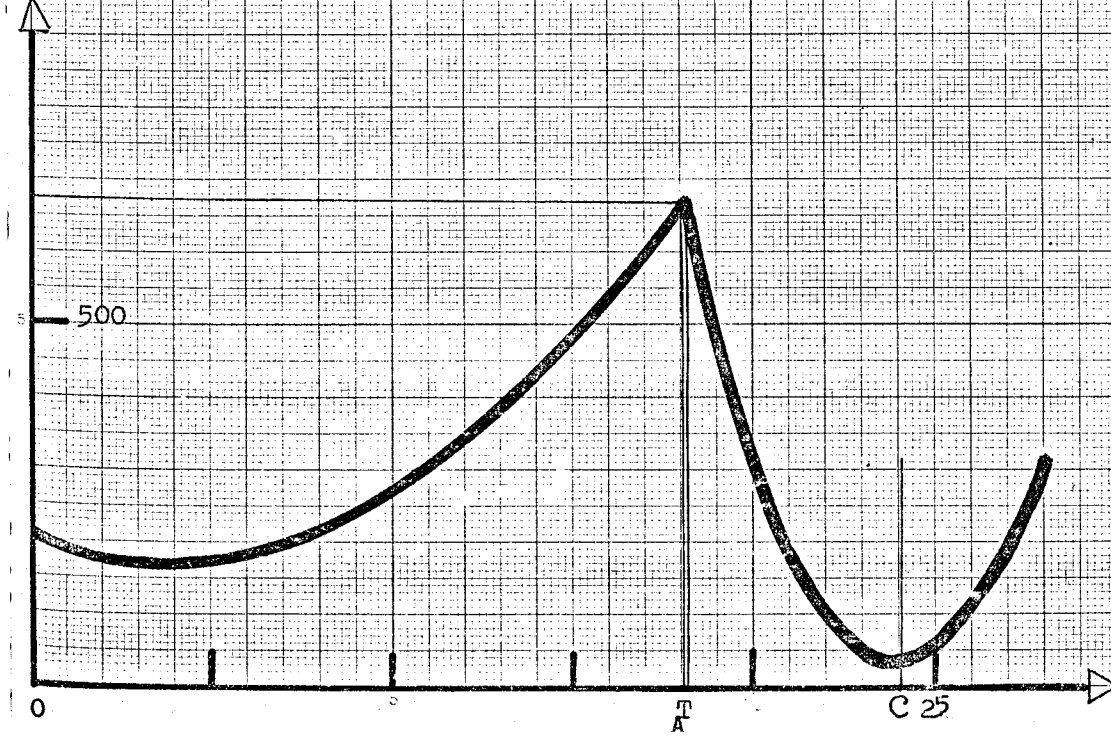
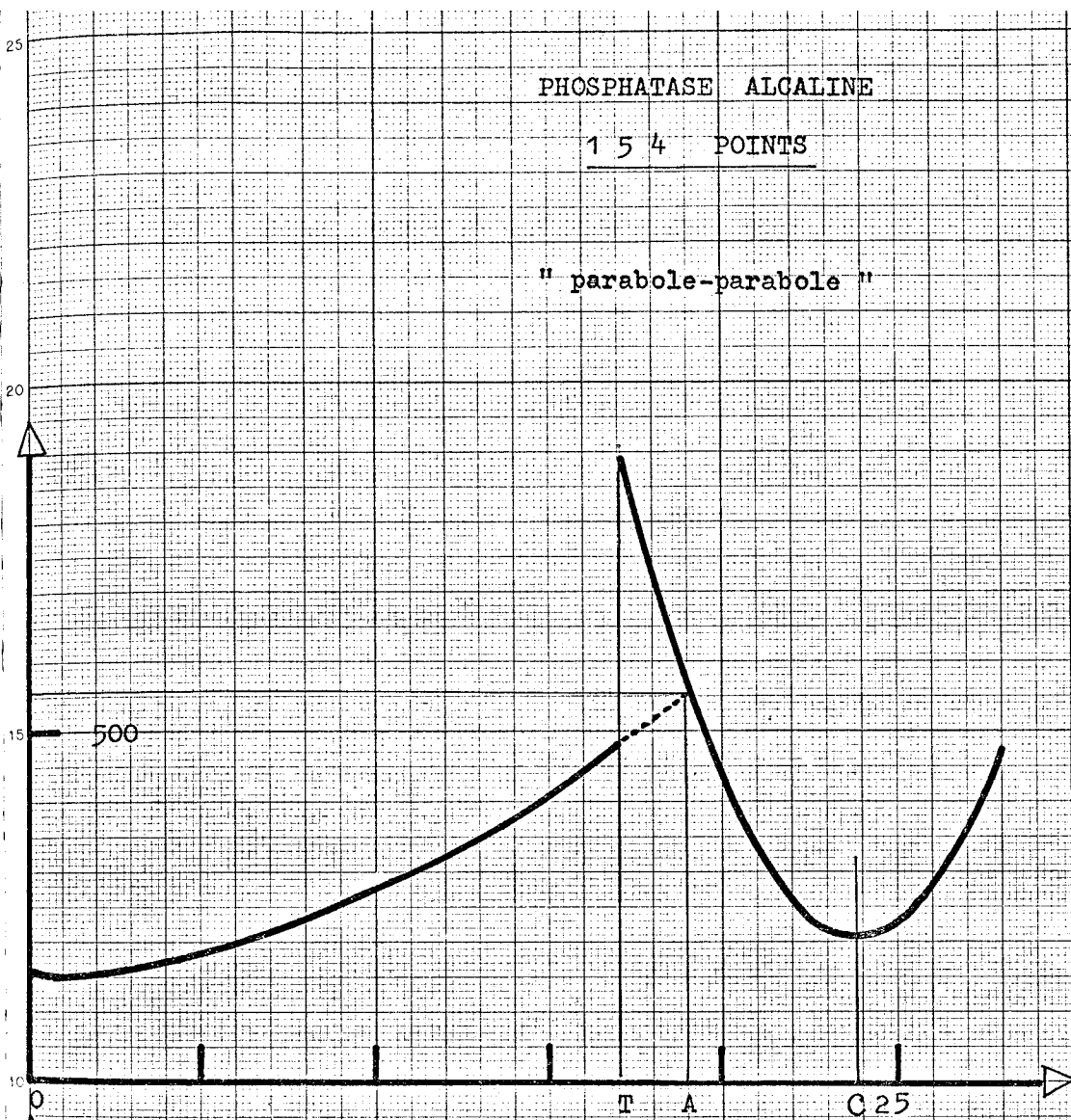


PHOSPHATASE ALCALINE

1 5 4 POINTS

" parabole-parabole "

Graphes n°11 n°

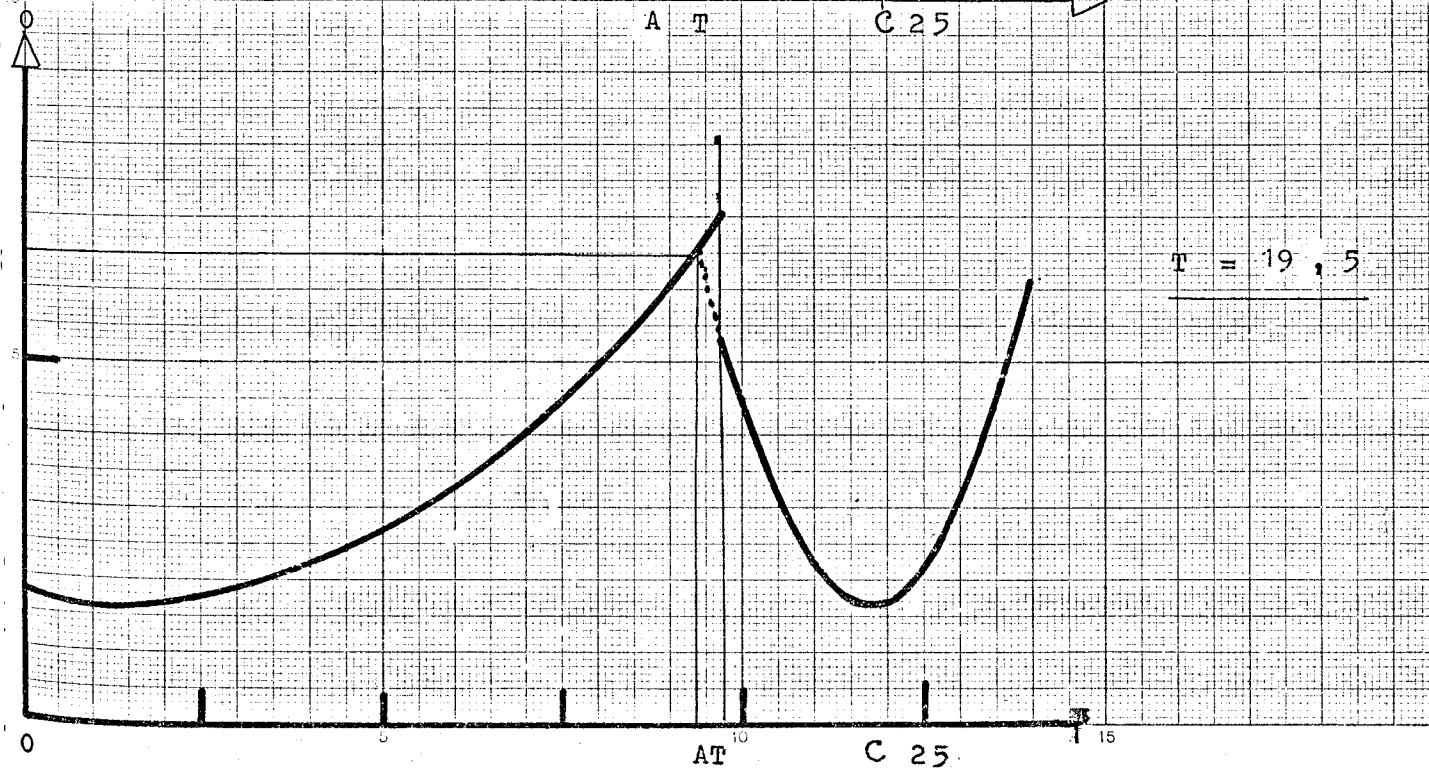
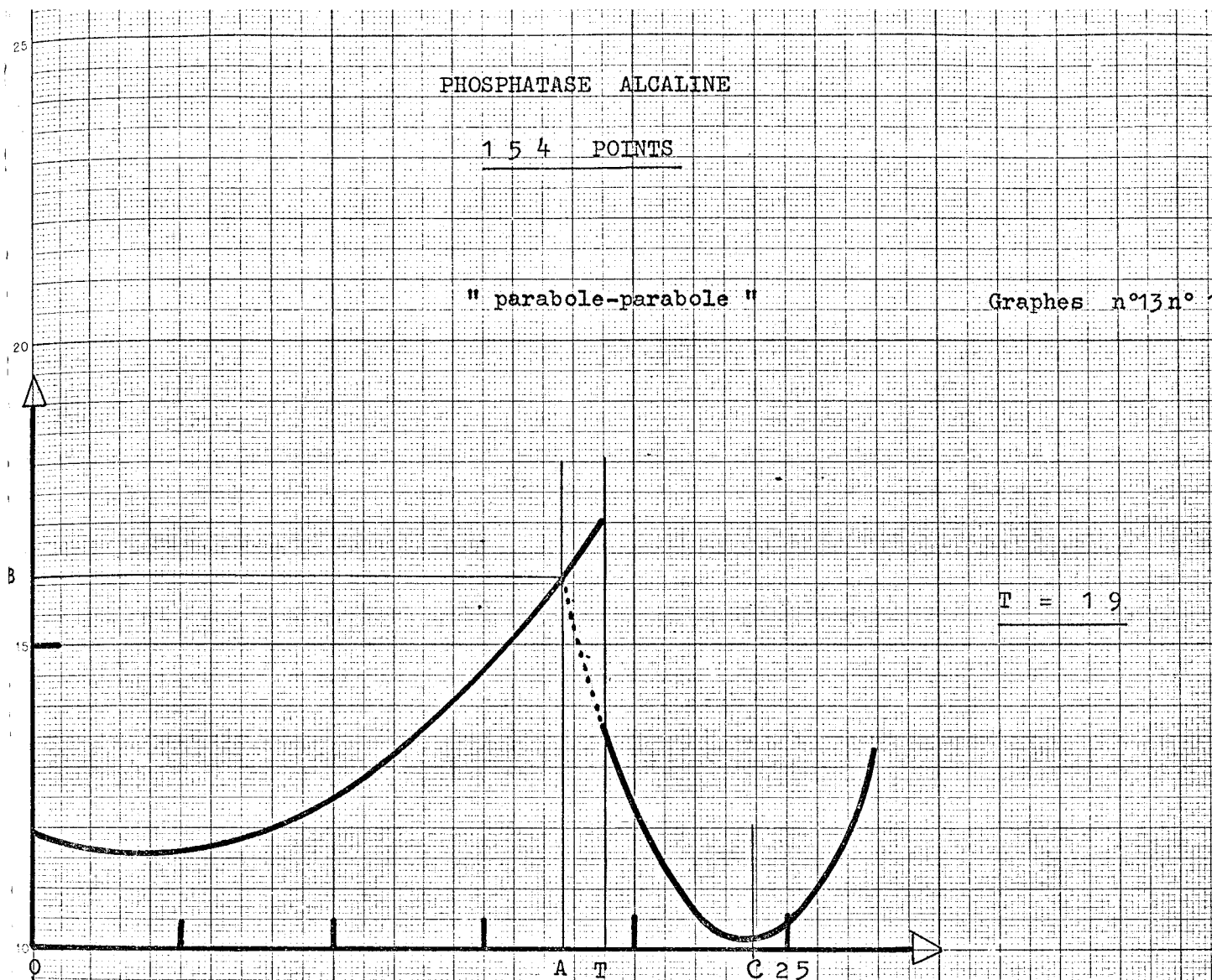


PHOSPHATASE ALCALINE

1 5 4 POINTS

" parabole-parabole "

Graphes n°13 n° 1

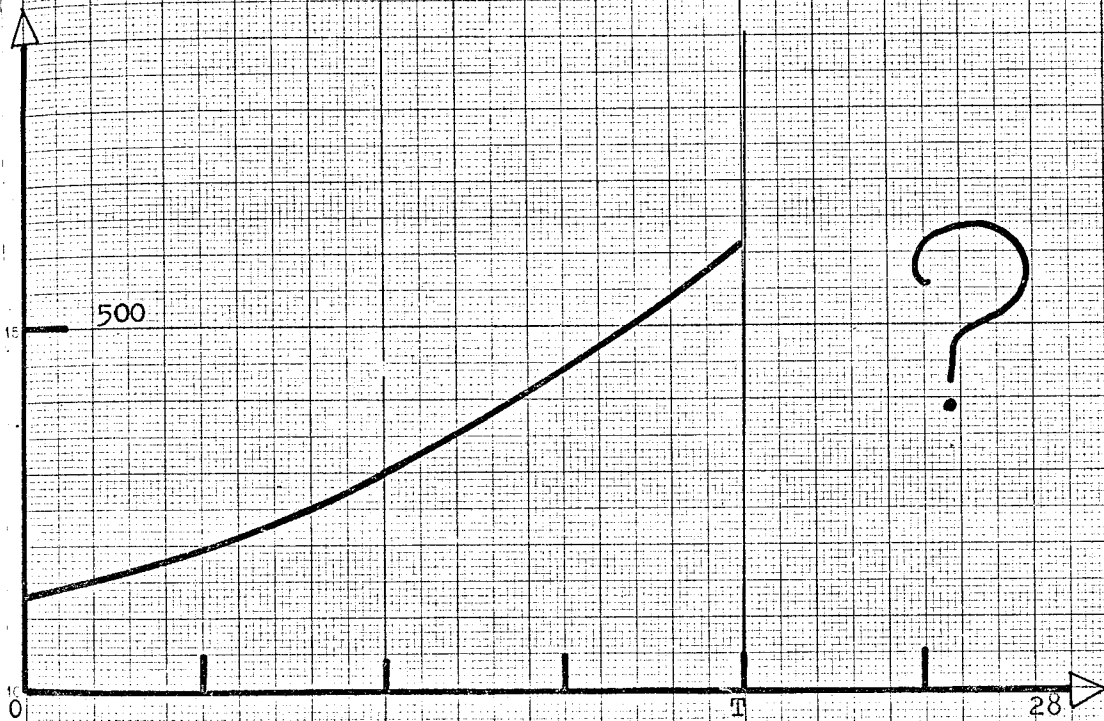


PHOSPHATASE ALCALINE

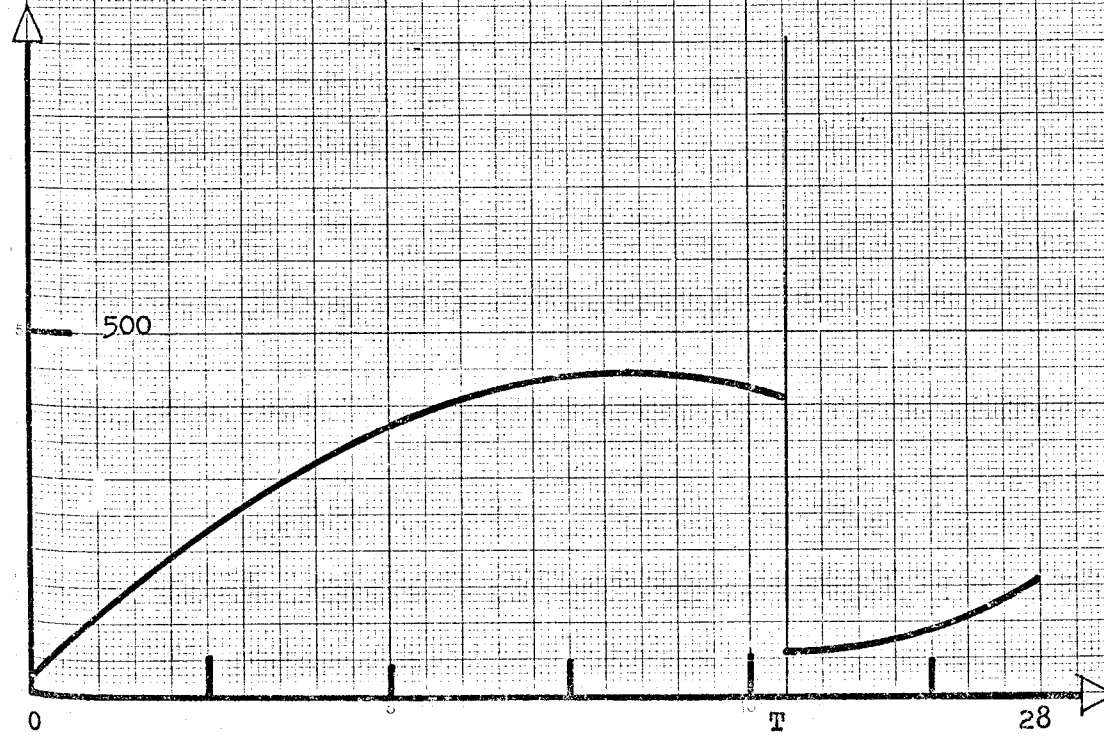
1.5 4 POINTS

"parabole-parabole"

Graphes n°15n° 16



T = 20



T = 21

Des essais ont été faits pour les valeurs suivantes de T :

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19,5, 20, 21 -

Le graphe n° 6 est celui de la somme des carrés des écarts en fonction de T ; l'allure de la ligne brisée obtenue est beaucoup plus régulière que celle du graphe n° 4 : le creux est entre les dates 17 et 19,5 ; il s'est donc resserré et on ne voit plus de pic. Néanmoins, remarquons que, si qualitativement la courbe est bien meilleure son point le plus bas est du même ordre de grandeur que celui du graphe n° 4.

Les paraboles obtenues sont celles portées sur les graphes n° 7 à n° 16.

Sur chacun de ces graphes, figurent aussi :

- la valeur de T -
- la droite parallèle à la direction des ordonnées et d'abscisse T -
- la position A de l'abscisse du point de rencontre des 2 paraboles -
- la position B de l'ordonnée de ce point de rencontre qui est aussi le maximum de la courbe.
- la position C de l'abscisse du minimum de la 2e parabole.

Pour T = 18 les paraboles se raccordent parfaitement :

A et T ont pratiquement la même valeur

T = 18

A = 18,13

Pour T = 19,5 le schéma de calcul est encore valable mais il ne l'est plus :

Pour T = 20 : en effet, la seconde parabole n'a pu être calculée en raison d'une discontinuité.

Pour T = 21 : on note une concavité de la première parabole tournée non plus vers le haut mais vers le bas et les 2 paraboles ont une intersection aberrante.

PHOSPHATASE ALCALINE 1 5 4 POINTS

JOURS DU CYCLE



Graphe de l'abscisse du maximum en fonction de T

Graphe n° 17

" parabole-parabole "

25

20

20

15

15

10

10

5

10

15

20

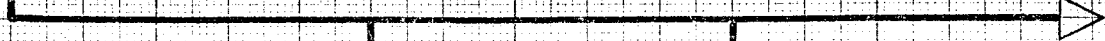
JOURS du CYCLE

T

5

10

15



PHOSPHATASE ALCAINE 1 5 4 POINTS

Taux de PHOSPHATASE ALCAINE

B

Graphe de l'ordonnée du maximum en fonction de T

Graphe n° 18

1000

" parabole-parabole "

20

15

500

10

5

0

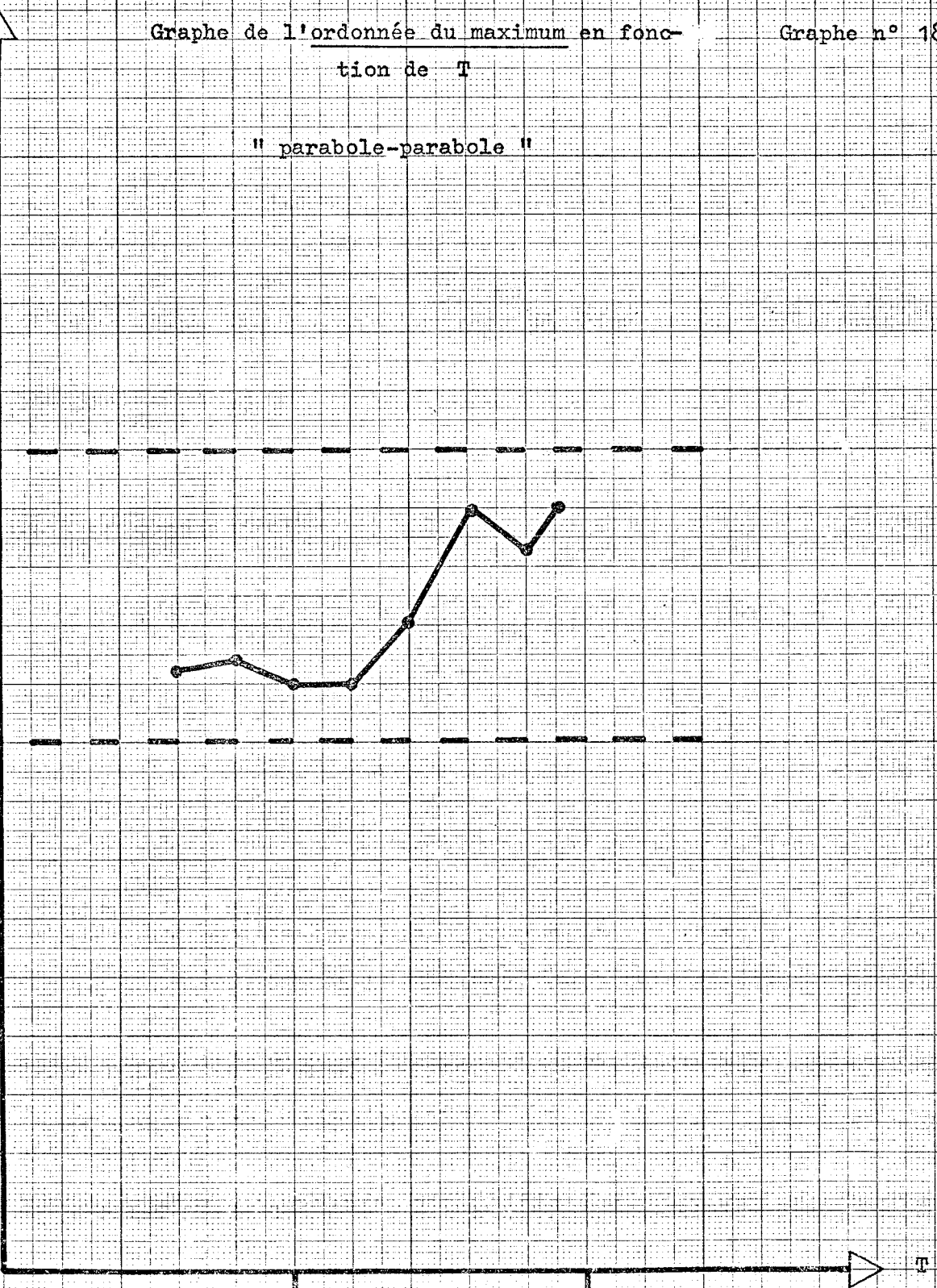
10

15

20

JOURS DU CYCLE

T



PHOSPHATASE ALCALINE 1 5 4 POINTS

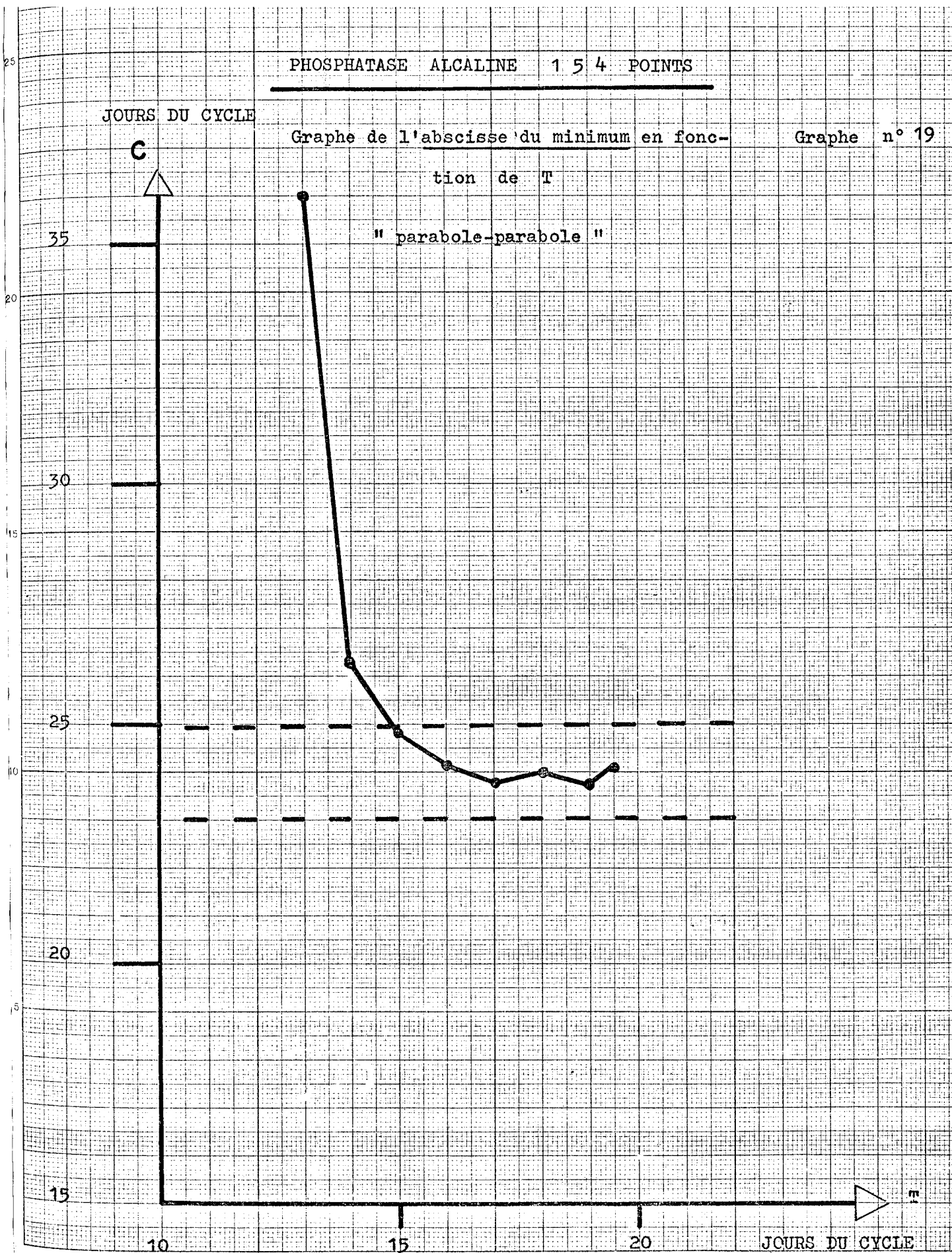
JOURS DU CYCLE

Graphe de l'abscisse du minimum en fonction de T

Graphe n° 19

C

"parabole-parabole"



PHOSPHATASE ALCALINE

SOLUTION OBTENUE PAR LE SCHEMA DE CALCUL

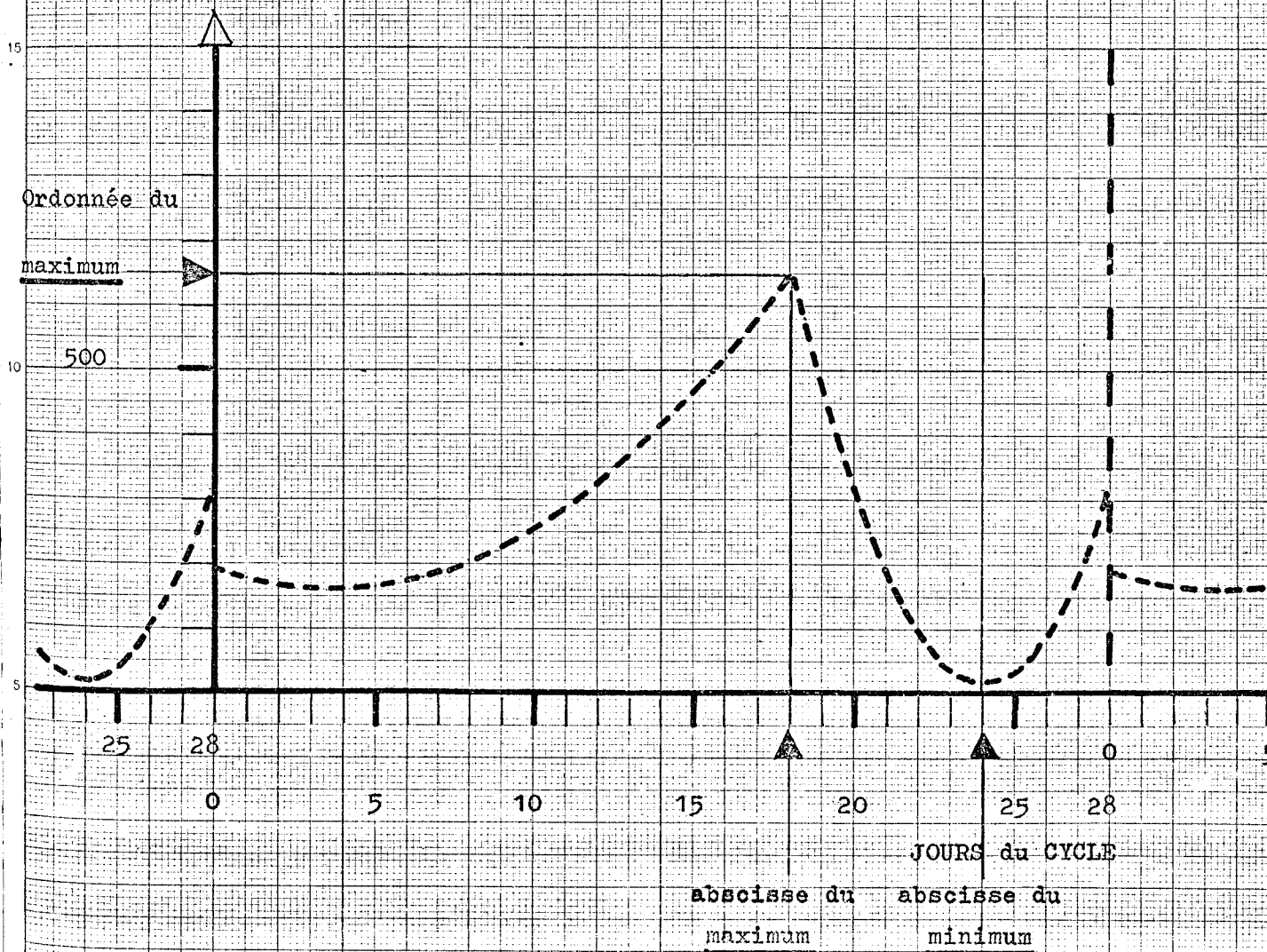
UTILISE DANS LA THESE DE M^r C. FEIGE

" parbole-parabole "

154 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n° 20

Taux de PHOSPHATASE ALCALINE au niveau
de l'endomètre exprimé en millimicromoles
de paranitrophénolphosphate en 10' à 37°
par mg de protéine .



Nous avons voulu estimer certaines grandeurs :

- La valeur de l'abscisse du maximum de la courbe : A
- la valeur de l'ordonnée du maximum de la courbe : B
- la valeur de l'abscisse du minimum de la 2^e parabole qui est aussi le minimum de la courbe : C

Ceci est illustré par les graphes n^os 17, 18, 19 -

- le graphe 17 est la variation de A en fonction de T
- le graphe 18 est la variation de B en fonction de T
- le graphe 19 est la variation de C en fonction de T.

Nous pouvons dire que :

- A est compris entre les dates 17 et 20 -
- B est compris entre les valeurs 450 et 700 -
- C est compris entre les dates 24 et 25 -

Le minimum variant entre de trop grandes limites, nous n'avons pas tenté d'évaluer son ordonnée.

Nous retiendrons une allure générale du phénomène, celle de la courbe correspondant à $T = 18$

Elle présente le meilleur raccordement pour les deux paraboles.

La somme des carrés des écarts est minimale à cette date.

Cette courbe a servi à réaliser le graphe n^o 20 aboutissement de nos travaux.

Nous insisterons
cependant sur certaines réserves.

L'allure générale de la courbe mathématique n'est pas nécessairement en chaque point celle du phénomène biologique étudié :

En particulier la discontinuité de la courbe calculée à la date théorique $T = 0$ n'est aucunement liée à un phénomène physiologique.

Il y a discontinuité car les courbes n'aboutissent pas au même niveau sur l'axe des ordonnées : juste avant la date 0 le taux a la valeur 300, juste après cette date il a la valeur 200. On sait que cette date n'est connue qu'avec une approximation de l'ordre de 24 heures.

Le maximum qui apparaît très nettement sur la courbe calculée à la date théorique $T = 18$ n'est peut-être pas en fait aussi marqué sur la courbe du déroulement du phénomène biologique pour un sujet donné.

Deuxième Partie

LA LACTATE DESHYDROGENASE

SES ISOENZYMES

LISTE DES 92 POINTS EXPERIMENTAUX

DATE HISTO- LOGIQUE	TAUX	SUJETS
1.0	116.0	BAC
1.0	236.0	SAN
1.0	291.0	VIN
1.0	536.0	N ARS
1.0	650.0	SOL
1.0	960.0	BUI
2.0	213.0	N BAL
2.0	496.0	N VEY
5.0	213.0	N SET
7.5	745.0	NIC
9.0	342.0	N DUB
9.0	944.0	LAL
10.0	163.0	N RAJ
10.0	218.0	RIC
11.0	370.0	BRE
11.5	414.0	BLA
14.0	118.0	BEN
14.0	373.0	N DUB
17.0	278.0	BAI
17.0	306.0	FEV
17.0	700.0	MOU
18.0	101.0	BOU
18.0	107.0	GRA
18.0	335.0	RIC
18.0	376.0	R MAG
18.0	384.0	COU
18.0	444.0	N SAL
18.0	628.0	ERL
18.0	685.0	REP
18.0	699.0	N YOU
18.0	861.0	R JUN
18.0	958.0	KAM
18.0	1150.0	REY
18.0	1310.0	GUE

DATE HISTO- LOGIQUE	TAUX	SUJETS
18.5	469.0	R TOU
19.0	280.0	TOM
19.0	1872.0	NOY
19.5	580.0	SER
20.0	510.0	CAR
20.0	543.0	BAR
20.0	614.0	MOU
20.0	790.0	ADB
20.0	912.0	CUI
20.0	1140.0	MEN
20.5	309.0	N SAE
21.0	94.0	CAR
21.0	192.0	CAR
21.0	298.0	CEZ
21.0	333.0	SAU
21.0	400.0	SAN
21.0	466.0	VIN
21.0	486.0	CAR
21.0	845.0	GUY
21.0	940.0	ROU
21.0	976.0	CEC
21.5	68.0	GOB
21.5	226.0	RIV
22.0	165.0	BER
22.0	414.0	MAS
22.0	595.0	TRE
22.0	659.0	ROS
22.5	378.0	VED
23.0	640.0	FAR
23.5	715.0	BEN
23.5	770.0	DIS

DATE HISTO- LOGIQUE	TAUX	SUJETS
24.0	230.0	PER
24.0	471.0	MIS
24.0	610.0	BOU
24.0	633.0	DIT
24.0	734.0	REV
24.0	930.0	BUT
24.5	540.0	GUE
25.0	312.0	RUS
25.0	344.0	N BUI
25.0	403.0	LUC
25.0	490.0	REG
25.0	642.0	GEI
25.0	680.0	RIC
25.0	1225.0	MAZ
26.0	190.0	COL
26.0	637.0	ALL
26.0	735.0	R VER
26.0	736.0	PAP
26.0	760.0	ROC
27.0	103.0	CON
27.0	104.0	SUR
27.0	118.0	LUC
27.0	335.0	JUL
27.0	700.0	MAR
28.0	424.0	HAD
28.0	604.0	BEN
28.0	660.0	LER

LA LACTATE DESHYDROGENASE GLOBALE

Avant de présenter notre travail sur les isoenzymes de la lactate deshydrogénase, nous avons voulu en prélude à des recherches ultérieures, fournir les résultats d'une étude biochimique globale de cet enzyme au cours du cycle en fonction des dates histologiques.

Nous présentons un tableau de résultats expérimentaux obtenus à partir de 92 observations choisies et classées selon les critères énoncés dans notre étude préliminaire (page 7)

GRAPHE DES POINTS EXPERIMENTAUX

Sur ce graphe n° 1 sont portées :

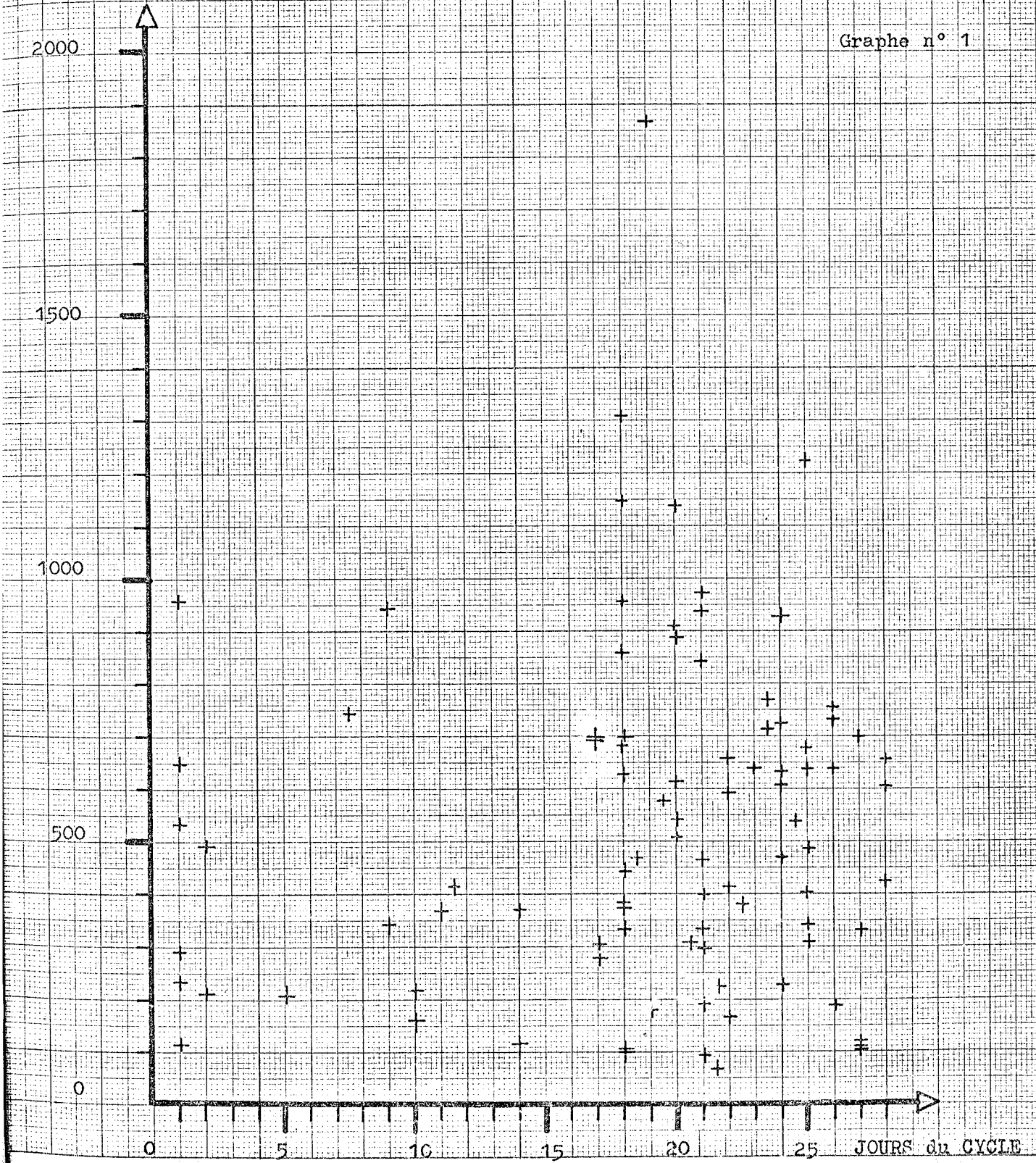
- en abcisses les dates histologiques exprimées en jour -
- en ordonnées les taux de L.D.H. GLOBALE exprimés en millimicromoles de N.A.D.H. par minute et par mg de protéine.

L. D. H. G L O B A L E

Taux de L. D. H. GLOBALE exprimé en millimicromoles de N. A. D. H. par minute et par mg de protéine

92 POINTS EXPERIMENTAUX

Graph n° 1



Il montre que la dispersion des mesures est réellement très grande, encore bien plus que pour la PHOSPHATASE ALCALINE.

Malgré le nombre des mesures retenues qui peut sembler relativement important à première vue, on ne peut faire, au vu de ces points, aucune hypothèse sur le phénomène étudié, même pas sur l'allure générale de la courbe qui le représente.

Néanmoins, nous avons voulu voir si certains ajustements selon le principe classique des moindres carrés permettaient certaines conclusions. Nous avons procédé à des ajustements linéaires, puis paraboliques.

AJUSTEMENT LINEAIRE

Les résultats sont concrétisés par les graphes n° 2 et n° 3.

Il est permis de dire, car la pente de la droite portée sur le graphe n° 2 est très faible, qu'il s'agit d'une fonction dont l'allure générale est peut-être croissante dans la première moitié du cycle environ. Si en fait certains extrema existent, nous n'en avons aucune idée.

Il serait vain d'accorder une importance aux valeurs numériques que l'on pourrait déduire de cette fonction linéaire.

Ce qui précède se rapporte à un ajustement linéaire sur l'ensemble des 92 points expérimentaux ; nous avons pensé qu'un ajustement linéaire, non pas sur l'ensemble des 92 points, mais sur une partie seulement de ceux-ci, pouvait peut-être donner quelque information locale supplémentaire.

Nous avons donc procédé à différents ajustements avec des points compris entre l'origine du cycle et une certaine date "T" fixée à priori. Ainsi il y a eu un calcul :

- pour T = 2
- puis pour T = 3
et ce, jusqu' à T = 28

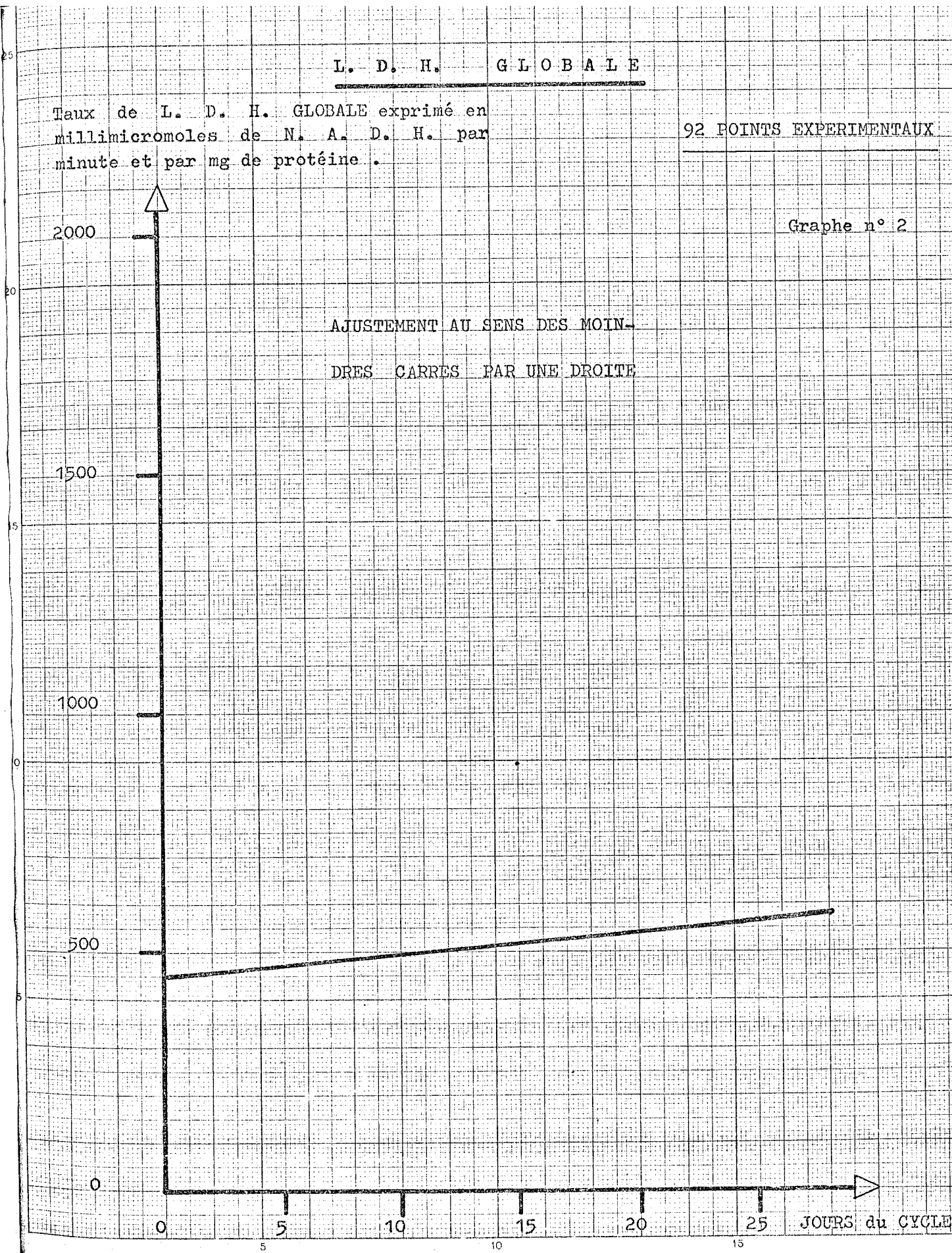
L. D. H. G L O B A L E

Taux de L. D. H. GLOBALE exprimé en millimicromoles de N. A. D. H. par minute et par mg de protéine .

92 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n° 2

AJUSTEMENT AU SENS DES MOINDRES CARRES PAR UNE DROITE



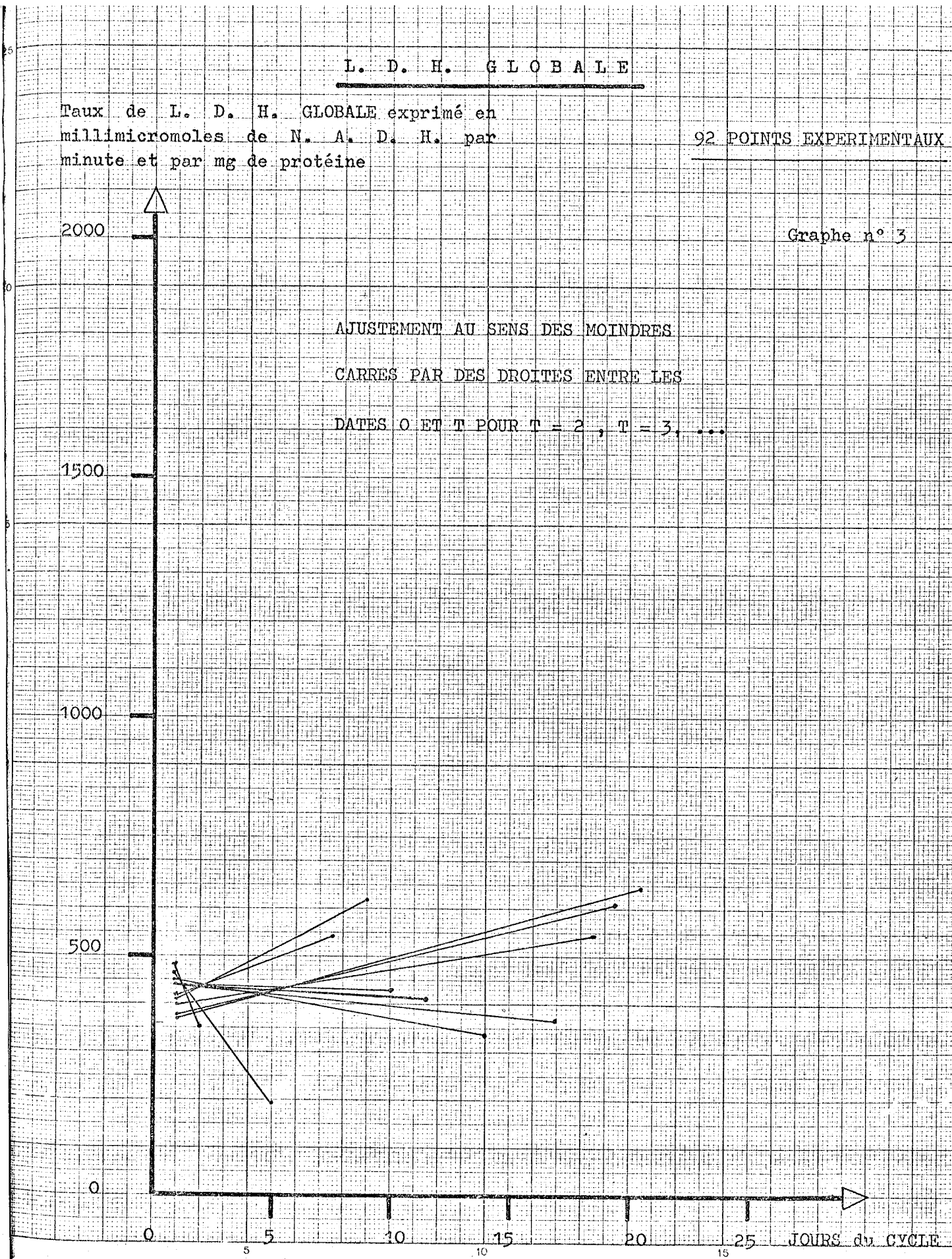
L. D. H. G L O B A L E

Taux de L. D. H. GLOBALE exprimé en millimicromoles de N. A. D. H. par minute et par mg de protéine

92 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n° 3

AJUSTEMENT AU SENS DES MOINDRES
CARRÉS PAR DES DROITES ENTRE LES
DATES 0 ET T POUR T = 2, T = 3, ...



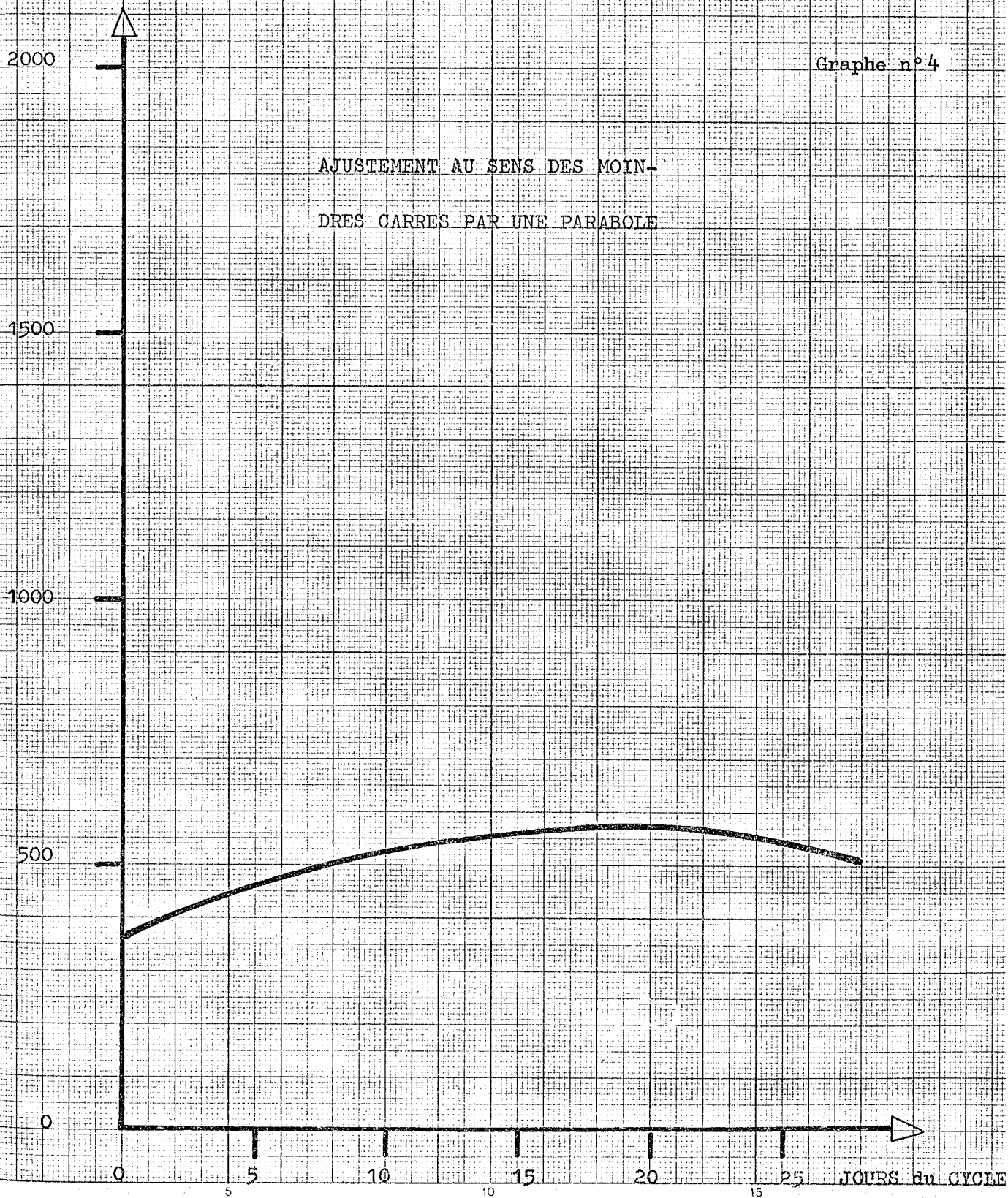
L. D. H. G L O B A L E

Taux de L. D. H. GLOBALE exprimé en millimicroles de N. A. D. H. par minute et par mg de protéine .

92 POINTS EXPERIMENTAUX

Graphe n°4

AJUSTEMENT AU SENS DES MOINDRES CARRÉS PAR UNE PARABOLE



Certains segments de droite ont été portés sur le graphe n° 3. L'allure désordonnée de ces segments de droite ne permet en fait aucune conclusion positive : il faut beaucoup plus de points avec une répartition, quant à la date au moins, la plus homogène possible.

AJUSTEMENT PARABOLIQUE

Le résultat de cet ajustement est la parabole portée sur le graphe n° 4.

Cet ajustement semble être plus convenable que l'ajustement linéaire :

- la somme des carrés des écarts était $9,11 \times 10^6$ pour l'ajustement linéaire sur les 92 points.

Sa valeur est $9,03 \times 10^6$ pour l'ajustement parabolique sur ces mêmes points.

Cette différence est en fait très faible.

L'allure générale croissante du début du cycle est confirmée. De plus, une décroissance apparaît vers la fin du cycle. En raison de la forme très plate de cette parabole, il est difficile d'affirmer qu'en fait le phénomène montre un maximum ; le maximum de la courbe ainsi calculée est situé au 19ème jour du cycle.

D'une façon générale, il est clair que ces calculs sont les premiers jalons d'une étude ultérieure qui peut demander des méthodes de calculs nouvelles et se révéler fort intéressante.

LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE

L'action enzymatique globale que nous venons d'observer dans l'endomètre peut n'être en réalité que la somme des activités résultant de composés enzymatiques distincts.

Ce chapitre de l'enzymologie ne prit vraiment toute son importance que lorsque VESELL et BEARN (111) montrèrent en 1957 pour la première fois que la lactate deshydrogénase existe sous des formes moléculaires multiples.

En 1959 MARKERT et MÖLLER (63) introduisirent le terme ISOZYME pour désigner ces fractions enzymatiques. Avec WEBB en 1965 on donne la préférence au terme ISOENZYME.

Tous les enzymologistes sont d'accord (SAYRE, HILL) pour dire que dans le cas de la lactate deshydrogénase, la notion d'isoenzyme est indiscutable.

DEFINITION DES ISOENZYMES

On appelle isoenzymes, les enzymes qui dans la même espèce ont une action de même type, c'est-à-dire qui catalysent la même réaction chimique et présentent une constitution protéinique semblable tout en se laissant néanmoins séparer par les différentes méthodes de la chimie protéique.

Par conséquent, les isoenzymes de la lactate deshydrogénase sont des enzymes qui catalysent l'oxydo-réduction de la réaction :

acide lactique \longrightarrow acide pyruvique, mais qui se laissent séparer par l'électrophorèse par exemple.

Les isoenzymes de la lactate deshydrogénase semblent être les seuls actuellement à avoir trouvé une application clinique, bien qu'un assez grand nombre de séries d'isoenzymes ait fait l'objet d'études en biologie clinique.

STRUCTURE DES ISOENZYMES

SIGNIFICATIONS PHYSICO-CHEMIE, PHYSIOLOGIQUE

En 1959, WIENE (121) a montré qu'il existe dans les tissus de l'homme, du rat et de la souris, ainsi que dans le sérum humain, 5 fractions isoenzymatiques de la lactate deshydrogénase.

Chacun de ces isoenzymes porte une charge électrique différente, de sorte que la séparation des différentes fractions par électrophorèse devient possible.

MARKERT, APPELLA (1961) (1), CAHN (1962) (13) ont démontré que les isoenzymes de la lactate deshydrogénase sont formés par 2 types d'unité protéinique qu'ils ont appelés :

type A, type B

Ces 2 types sont combinés en groupes de 4 tétramères, de sorte qu'il existe 5 combinaisons possibles :

A A A A
A A A B
A A B B
A B B B

Les formes moléculaires multiples résultent du mode particulier d'association des chaînes polypeptidiques constitutives. En d'autres termes (GEYER H., HEIL P. (1970) (37) - il existe 2 peptides fondamentaux "H" et "M". Deux isoenzymes sont homogènes, que l'on peut représenter par H_4 et M_4 . A leur côté, on rencontre les 3 hybrides prévisibles :

MH_3
 M_2H_2
 M_3H

Chaque forme de tétramère correspond à une bande électrophorétique distincte et possède une constante de Michaëlis propre pour le coenzyme.

La combinaison de 4 unités identiques de type B définit LA FRACTION ISOENZYME I de la lactate deshydrogénase. Elle porte la charge négative la plus forte.

La combinaison de 4 unités de type A détermine LA FRACTION V. Elle n'est pratiquement pas chargée électriquement.

Par conséquent, pendant l'électrophorèse, la fraction I se déplacera vers l'anode, tandis que la fraction V ne se déplacera pas. LDH I et LDH II sont souvent appelées les formes rapides de la lactate deshydrogénase, en contraste avec les formes lentes LDH IV et LDH V.

L'emploi de techniques très différentes, à savoir :

- WIEME, 1959-1965 : électrophorèse en gélose
- VESELL, BEARN : en support d'amidon
- SAYRE, HILL : sur papier d'acétate de cellulose
- PRESTON et coll. : en gel d'acrylamide

a fourni des résultats comparables : fait souligné par VESELL en 1965.

On peut distinguer les tissus et les organes les uns des autres, compte-tenu des proportions relatives de leurs isoenzymes. Presque tous les tissus animaux possèdent les 5 isoenzymes. Les hématies du lapin ne renferment cependant que l'isoenzyme rapide I (H_4). Dans les muscles striés du même animal on ne retrouve que l'isoenzyme V (M_4).

Chez l'homme adulte (et dans la plupart des espèces) on peut caractériser 2 types principaux de la lactate deshydrogénase :

- le type "muscle squelettique" "H" (muscle) caractérisé par la prédominance de la bande lente (LDH V). On retrouve cette prédominance de LDH V dans le muscle strié, le tissu hépatique, le coeur.
- le type "coeur", "H" (heart) est la fraction prépondérante dans le muscle cardiaque et se caractérise par une prédominance de la bande rapide.

Ces 2 types de sous-unités sont immunologiquement distincts ; leur poids moléculaire est comparable et leur composition en acides aminés différente. 1964 FONDY et coll., PESCHE et coll. ont déterminé la composition en acides aminés des 2 types extrêmes de la lactate deshydrogénase : le type "H" contient moins de phénylalanine que le type "M" par exemple.

Cette structure a été démontrée par l'expérience suivante : MARKERT et coll.. On dissocie par NaCl les tétramères purs A_4 et B_4 , puis dans une seconde étape on effectue la réassociation des monomères. On étudie ensuite la composition du milieu par électrophorèse en gélose et on retrouve 5 bandes caractéristiques.

Remarque : La biosynthèse des monomères A et B est commandée par des gènes différents. En effet, des mutations du gène B ont été découvertes. Les sujets hétérozygotes synthétisent à la fois des monomères B et des monomères B mutés (type β)

Dans ce cas, un grand nombre d'associations est possible et décelable en électrophorèse.

Exemple : $B_4 - B_3^{\beta} - B_2 A_2 - B_1 \beta_3 - \beta_4$

La concentration relative de chaque fraction diffère toutefois d'un tissu à l'autre. Soulignons que ce sera un de nos buts que de vouloir apprécier ces concentrations relatives au niveau de l'endomètre humain.

Nous rapportons quelques exemples d'isoenzymogrammes:

ISOENZYMOGRAMMES

Fractions de la lactate deshydrogénase présentes dans les tissus humains -

	LDH I	LDH II	LDH III	LDH IV	LDH V
Muscle cardiaque	35,0	25,6	11,8	16,4	10,8
Foie	2,0	4,3	11,0	27,0	55,7
Peau	trace	trace	31,0	31,0	38,0
Muscle strié	4,0	7,0	21,0	27,0	41,0
Placenta	12,0	18,0	15,0	30,0	25,0
Thymus	10,0	11,0	30,0	28,0	21,0
Tissu cancéreux ..	20,0	13,0	26,0	23,0	17,0
Globules rouges ...	39,0	56,0	5,0	trace	trace

Pourcentages calculés d'après une méthode spectrophotométrique décrite par WIEME (1964).

	LDH I	LDH LI	LDH III	LDH IV	LDH V
Coeur	48	35	13	2	1
Cerveau	25	29	31	14	1
Pancréas	27	32	27	9	5
Rein	33	34	24	7	1
Globules rouges ..	36	44	15	4	2
Placenta	20	30	30	10	10
Prostate	3	21	48	24	4
Thyroïde	5	22	35	27	11
Surrénales	4	19	37	33	9
Poumon	4	14	32	30	20
Myomètre	5	21	48	21	5
Rate	5	14	29	32	20
Moelle osseuse ...	4	13	23	30	25
Leucocytes	3	15	22	13	45
Foie	1	2	7	12	77
Muscles abdominaux : deshydrogénase lactique 5 presque pure.					

Valeurs pour 100 de l'isoenzyme I à l'isoenzyme V dans quelques organes (rapportés par LECLERC M., COSSON G.)

Quelques commentaires selon SIMON K.H. (1968) (99)

Le coeur, le cerveau, les globules rouges, les reins (corticale) sont caractérisés par la prédominance des isoenzymes rapides.

Dans le foie, les muscles striés, les organes lymphoïdes, on trouve davantage de fractions lentes. Les autres organes ont un type intermédiaire entre les types "coeur" et "muscle". Coeur, cerveau, globules rouges et reins sont connus pour leur grande consommation d'oxygène et s'agit-il simplement d'une coïncidence si les valeurs des fractions rapides sont plus élevées?

Signalons en outre que les spermatozoïdes contiennent un 6^o isoenzyme (L D X), dont la vitesse de migration se situe entre celle de la LDH III & de la LDH IV.

Ce même auteur (99) précise que :

- dans les tissus lymphatiques et les tumeurs malignes, la répartition des isoenzymes est assez régulière -
- dans le sérum, on trouve pendant la destruction de cellules dans le coeur, les reins et les globules rouges, un accroissement des isoenzymes I et II.
- dans des lésions de la musculature squelettique et du foie, on note un accroissement de la fraction V.
- Le quotient $\frac{LDH\ I}{LDH\ V}$ varie chez l'homme et pour certains organes, de la manière suivante :

- muscle cardiaque	=	1
- érythrocytes	≈	0,9
- foie, muscles du squelette	=	0,3 à 0,4
- sérum normal	=	0,62 à 0,82

- précise aussi qu'il existe des différences entre les tissus embryonnaires et les tissus adultes. Dans le foie de l'embryon humain les 2 monomères sont synthétisés d'une façon égale et les isoenzymes existent comme l'exigent les probabilités (prédominance du type III) Chez l'adulte l'isoenzyme V prédomine soit par activation du gène "II", soit par inhibition du gène "III".

L'équilibre entre les fractions lentes IV, V et rapides I, II de la lactate deshydrogenase dans les tissus va refléter le métabolisme intermédiaire de ces tissus.

Dans un tissu présentant une bonne oxygénation la LDH I prédomine : KAPLAN et coll. constatent que la LDH I est prépondérante dans les tissus dont le métabolisme est aérobie. PFLEIDERER et WACHMUTH (1961) croient pouvoir conclure que la LDH I, II et III représentent plutôt la glycolyse aérobie, tandis que IV et V reflètent l'anaérobie : I et II sont parfois appelées fractions aérobie de la LDH, IV et V fractions anaérobies.

DENIS, PROUT (21) remarquèrent également les faits suivants : dans les tissus qui utilisent surtout la glycolyse aérobie (cerveau, coeur, reins) les fractions LDH I, II, III sont plus abondantes. Par contre, les tissus où la glycolyse anaérobie prédomine (muscle, foie, peau) III, IV, V sont plus élevées. (on constate les mêmes phénomènes dans les carcinomes prostatiques). Nous verrons plus loin que les travaux de RODDICK, GORDON, MIDBOE confirment ces faits.

Aussi nous semble-t'il permis de suggérer que dans la dernière phase du cycle menstruel, ou dans un endomètre sous progestatifs oraux ou encore au cours d'une grossesse, la glycolyse anaérobie est plus active qu'en phase de prolifération.

Ceci n'implique pas que la présence ou l'absence d'une hormone particulière (oestrogène ou progestérone) soit importante, mais cela reflète l'activité métabolique à l'intérieur d'un tissu à un temps donné, en fonction d'un certain stimulus.

Notes complémentaires :

La LDH V va donc plutôt catalyser la réaction :

- acide pyruvique \rightleftharpoons acide lactique, ce qui en l'absence d'oxygène régénère la forme réduite du coenzyme A.

La LDH I par contre favorise la réaction :

- acide lactique \rightleftharpoons acide pyruvique, après quoi l'acide pyruvique pourra être catabolisé suivant le cycle de Krebs, avec une production d'énergie beaucoup plus élevée.

(1960) PLAGEMAN, GREGORY, WROBLEWSKI (78) ont démontré que la LDH V continue à exercer son activité à une concentration de pyruvate 10 fois plus forte que la concentration optimale pour la LDH I.

Donc un excès de pyruvate inhibera la LDH I plutôt que la LDH V ; en d'autres termes, la LDH I est plus sensible à la concentration en acide pyruvique que la fraction V.

C'est d'ailleurs cette caractéristique qu'utilisèrent en 1965 BONAVIDA et coll. pour différencier les fractions de la LDH.

SCHEMA DIRECTEUR

Selon ERICKSON (1961) le nombre des isoenzymes dans les tissus n'est pas seulement spécifique de l'espèce mais aussi de l'organe.

Par conséquent il nous a semblé permis de penser que les tissus du tractus génital féminin possèdent un en-

semble d'isoenzymes de la LDH, qui leur est propre.

Il a fallu attendre les travaux de J.W. RODDICK, Jr. M.D GORDON, K.C. ING, M.D. DEAN, MIDBOE B.S (88), pour qu'un auteur rende compte de cet ensemble isoenzymatique de la lactate deshydrogénase des tissus normaux (ou anormaux)

RODDICK, ING, MIDBOE ont déterminé les fractions isoenzymatiques de la lactate deshydrogénase ; en outre, compte-tenu des variations cycliques de croissance et de fonction subies par l'endomètre, ils ont émis l'hypothèse qu'il pourrait exister une différence dans l'ensemble des isoenzymes pendant les différentes phases du cycle menstruel.

RODDICK, GORDON, MIDBOE ont utilisé la technique de NACHLAS et A₃s.(67) modifiée par DENIS, PROUT et VANSANDE (18) : électrophorèse sur gel agar avec tissus homogénéisés, l'activité LDH ayant été démontrée suite à la réaction acide lactique \longrightarrow acide pyruvique, avec libération d'ions hydrogène produisant une réaction colorée avec un sel de tétrazolium.

Leurs travaux ont porté sur 39 femmes, classées selon la phase du cycle :

- phase proliférative	16 cas)
- phase sécrétoire	23 cas)
	Total 39 cas
- femmes en cours de grossesse	8 cas
- femmes sous progestatifs oraux	...	<u>2 cas</u>
	Total général 49 cas

Les résultats :

(Les différents pourcentages des 5 fractions furent estimés d'après l'intensité d'une réaction colorée).

- Phase profiférative :

- Concentration maximum en fraction enzymatique I, II, III -

- Phase sécrétoire :

- Concentration III, IV, V

Ces auteurs précisent que l'on obtient au cours de la grossesse, ou sous l'influence de progestatifs oraux, les mêmes résultats que dans la phase sécrétoire.

T.L. GOODFRIEND, N.O. KAPLAN (42) 1966, pensent que les facteurs induisant ces variations sont sans doute hormonaux : une augmentation du pourcentage de la fraction du type "M" a été trouvée dans l'utérus 24 heures après l'administration d'oestradiol, et ces auteurs montrent comment la production d'oestrogènes par les ovaires chez la rate varie selon les phases du cycle.

Ces variations trouvées dans les pourcentages des fractions "M" sont en accord avec les valeurs de la production oestrogénique.

D'autres facteurs tels qu'un changement de la tension intra-utérine en oxygène (89) sont moins susceptibles d'avoir une signification.

Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'accroissement de la LDH type "M" est actuellement inconnu: il semblerait que les oestrogènes soient responsables de cet accroissement, de préférence à la progestérone ou aux deux hormones à la fois. Ceci fut mis en évidence lorsqu'il fut trouvé que les valeurs de la LDH type "M" dans la phase sécrétoire tardive étaient très similaires à celles trouvées dans un endomètre hyperplasique dans ce cas, du fait de l'absence d'ovulation, il n'y a pas de sécrétion de progestérone.

D'ailleurs 1964 GOODFRIEND et KAPLAN (42) ont trouvé que l'oestradiol augmente d'une façon préférentielle la fraction LDH type "M" de l'utérus de la rate et de la lapine, et ils ont montré que cet effet est aboli par l'actinomycine D.

Récemment, utilisant des techniques histochimiques quantitatives sur des cultures d'endomètre humain (1969)

WILSON (132) montra que l'activité LDH globale doublait après un traitement aux oestrogènes pendant une durée de 5 heures, et que l'effet des oestrogènes était aboli après actinomycine D :

ceci laisse penser que la formation de molécules nouvelles d'enzyme était stoppée.

(1969) P.F. FOTTRELL, S.R. CARMEL,
M. SPELLMAN, E. O' DWYER (32) ont repris les travaux de
D.G. Mc KAY (64)
E. WILSON (132)
J.W. RODDICK (88)

sur le mécanisme d'action des oestrogènes et de la progestérone, en travaillant sur la LDH globale et ses isoenzymes au cours du cycle de l'endomètre humain.

Phase du cycle menstruel	Nombre d'observations	Fraction "F" %	Isoenzymes de la LDH (% de la totalité)				
			LDH I	LDH II	LDH III	LDH IV	LDH V
Phase proliférative	7	11,1	64,9	29,6	4,9	0,5	0,1
Phase secrétoire précoce	4	17,4	48,3	38,0	12,0	1,6	0,1
Phase secrétoire tardive	15	32,3	20,3	39,4	30,1	9,0	1,2

Commentaires :

- Dans la phase secrétoire tardive le pourcentage du type "F" de la LDH est presque trois fois plus important que dans la phase proliférative (A.E.H. EMERY)
- Dans la phase secrétoire précoce, le pourcentage a une valeur intermédiaire.
- Au cours du cycle les pourcentages des fractions III, IV, V, s'accroissent d'une façon considérable.

L. D. H. ISOENZYMES

LISTE DES 34 POINTS EXPERIMENTAUX

DATE HISTO- LOGIQUE	GLOBALE	I	II	III	I V	V	SUJETS
1.0	116.0	22.0	32.0	20.0	20.0	6.0	BAC
1.0	291.0	7.0	18.0	36.0	38.0	2.0	VIN
1.0	536.0	22.0	32.0	20.0	20.0	6.0	N ARS
1.0	650.0	7.0	39.0	35.0	17.0	2.0	SOL
11.0	370.0	9.0	30.0	36.0	20.0	5.0	BRE
18.0	107.0	7.0	19.0	29.0	25.0	20.0	GRA
18.0	384.0	1.0	6.0	21.0	41.0	31.0	COU
18.0	628.0	8.0	22.0	29.0	23.0	18.0	ERL
18.0	685.0	5.0	23.0	33.0	27.0	12.0	REP
18.0	1150.0	4.0	21.0	30.0	30.0	15.0	REY
18.0	1310.0	4.0	9.0	30.0	33.0	24.0	GUE
20.0	510.0	3.0	13.0	23.0	32.0	29.0	CAR
20.0	543.0	5.0	29.0	38.0	23.0	5.0	BAR
20.0	912.0	2.0	13.0	43.0	15.0	27.0	CUI
21.0	298.0	2.0	9.0	22.0	31.0	36.0	CEZ
21.0	333.0	2.0	10.0	23.0	32.0	33.0	SAU
21.0	940.0	5.0	17.0	26.0	26.0	26.0	ROU
22.0	165.0	4.0	15.0	18.0	17.0	46.0	BER
22.0	595.0	7.0	18.0	27.0	27.0	21.0	TRE
22.0	659.0	3.0	14.0	21.0	30.0	32.0	ROS
24.0	610.0	6.0	11.0	17.0	31.0	35.0	BOU
24.0	930.0	1.0	7.0	24.0	34.0	34.0	BUT
25.0	312.0	5.0	1.0	23.0	30.0	41.0	RUS
25.0	403.0	3.0	2.0	2.0	15.0	78.0	LUC
25.0	490.0	2.0	8.0	13.0	17.0	60.0	REG
25.0	1225.0	2.0	12.0	20.0	30.0	36.0	MAZ
26.0	736.0	2.0	5.0	18.0	37.0	38.0	PAP
26.0	760.0	1.0	3.0	12.0	39.0	45.0	ROC
27.0	104.0	4.0	3.0	21.0	25.0	47.0	SUR
27.0	118.0	3.0	2.0	2.0	15.0	78.0	LUC
27.0	700.0	2.0	7.0	20.0	36.0	35.0	MAR
28.0	424.0	5.0	15.0	26.0	23.0	31.0	HAD
28.0	604.0	2.0	5.0	18.0	36.0	39.0	BEN
28.0	660.0	3.0	5.0	8.0	20.0	64.0	LER

NOS RESULTATS

Pour une meilleure compréhension de la dépendance hormonale de la synthèse de la lactate deshydrogénase, nous avons cherché à déterminer l'isoenzymogramme de l'endomètre et à savoir, si pendant le cycle de femmes normalement menstruées, il se passe des transformations de l'échantillon d'isoenzyme dans l'endomètre.

Nous répartissons nos résultats en 2 séries :

- 1ère série :

- Biopsies effectuées du 1er au 15e jour du cycle -

- 2ème série :

- Biopsies effectuées après le 15e jour.

soit : 5 observations dans le 1er cas -
29 observations dans le second.

Total 34 observations

Nous avons classé nos données en fonction des phases du cycle : date histologique, sans tenir compte ni de l'âge, ni du poids, ni de la parité des patientes.

Nous avons voulu préciser

que :

- l'endomètre possède un ensemble d'isoenzymes qui lui est propre (séparation électrophorétique)

Il présente les fractions rapides I, II, III (type "H") et les fractions lentes IV et V (type "M").

Présentation de l'isoenzymogramme de nos 34 biopsies
page ~~précédente~~

- la concentration relative (valeurs pour 100) de chaque fraction subit des variations en fonction des phases du cycle :

En période préovulatoire, nous constatons une concentration maximum des fractions rapides (I, II, III-)

En phase postovulatoire (secrétoire) se manifeste une concentration maximum de fractions lentes (IV, V)

- En outre, l'importance prédominante des fractions lentes IV et V en période postovulatoire peut nous permettre de déduire que la glycolyse anaérobie est plus active dans cette 2e phase qu'en phase de prolifération.

A la lecture de notre tableau dans la phase sécrétoire tardive, on peut affirmer au vu de nos résultats, que le pourcentage du type "M" est presque 3 fois plus important que dans la phase proliférative.

Dans la phase sécrétoire précoce, les valeurs de "M" sont intermédiaires.

REALISATION DES GRAPHES ET DES CALCULS

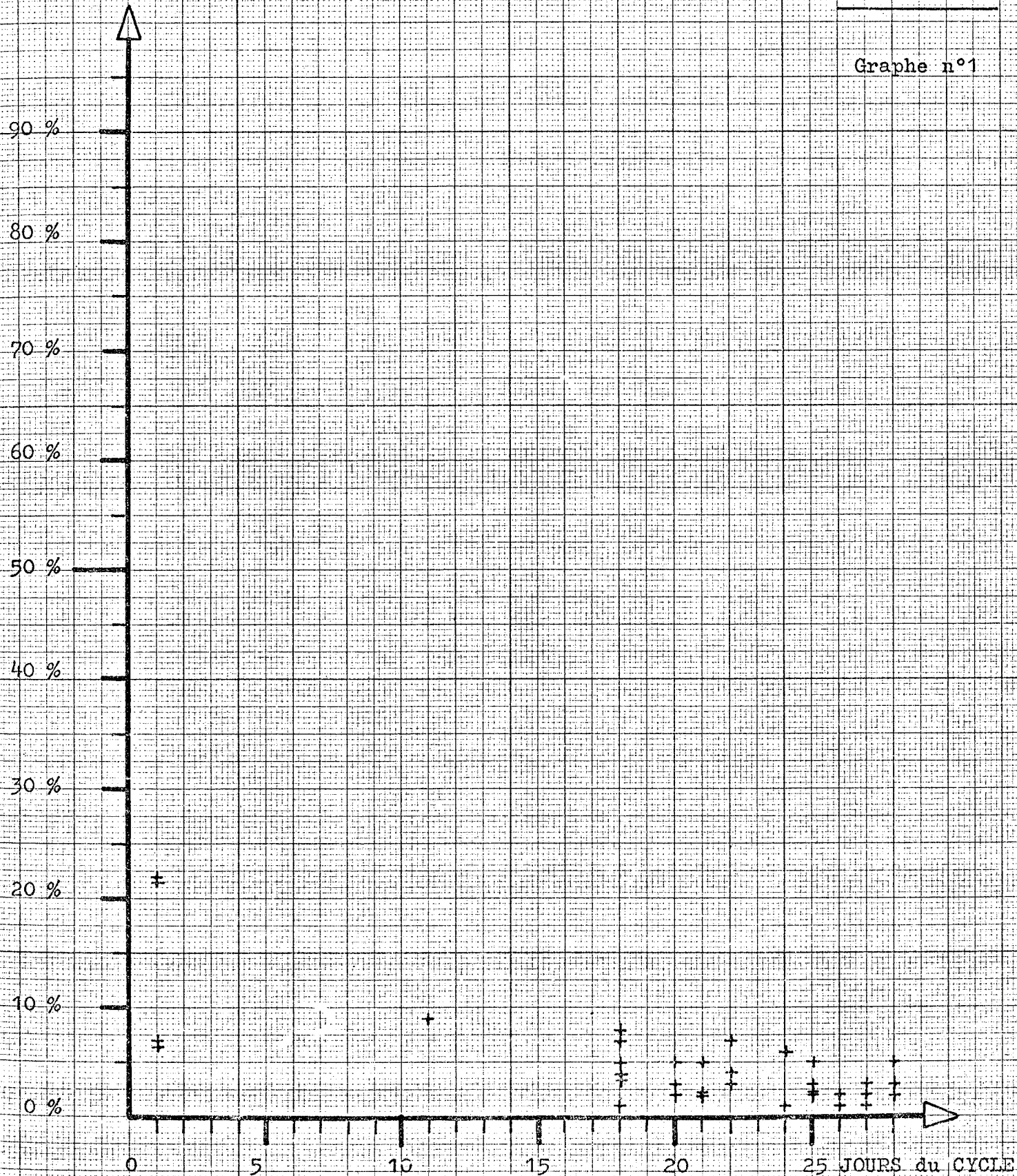
La 1ère série de graphes comprend les graphes n° 1 à 4. Ils correspondent aux 5 fractions mesurées : I, II, III, IV, V. La dispersion des points est ici encore très grande.

L. D. H. ISOENZYMATIQUES

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n°1

Pourcentage de
la fraction I

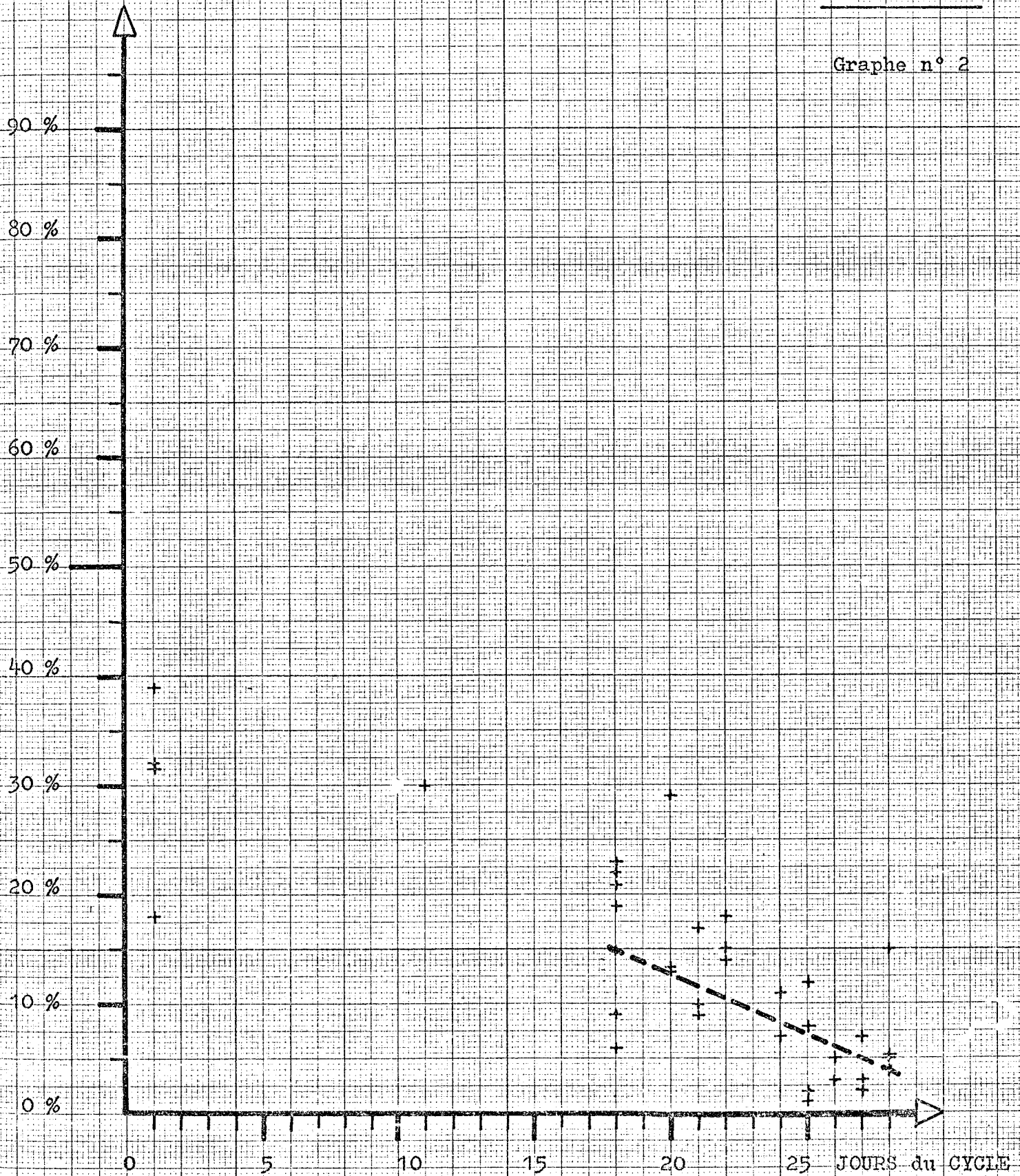


L. D. H. I S O E N Z Y M A T I Q U E S

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 2

Pourcentage de
la fraction II

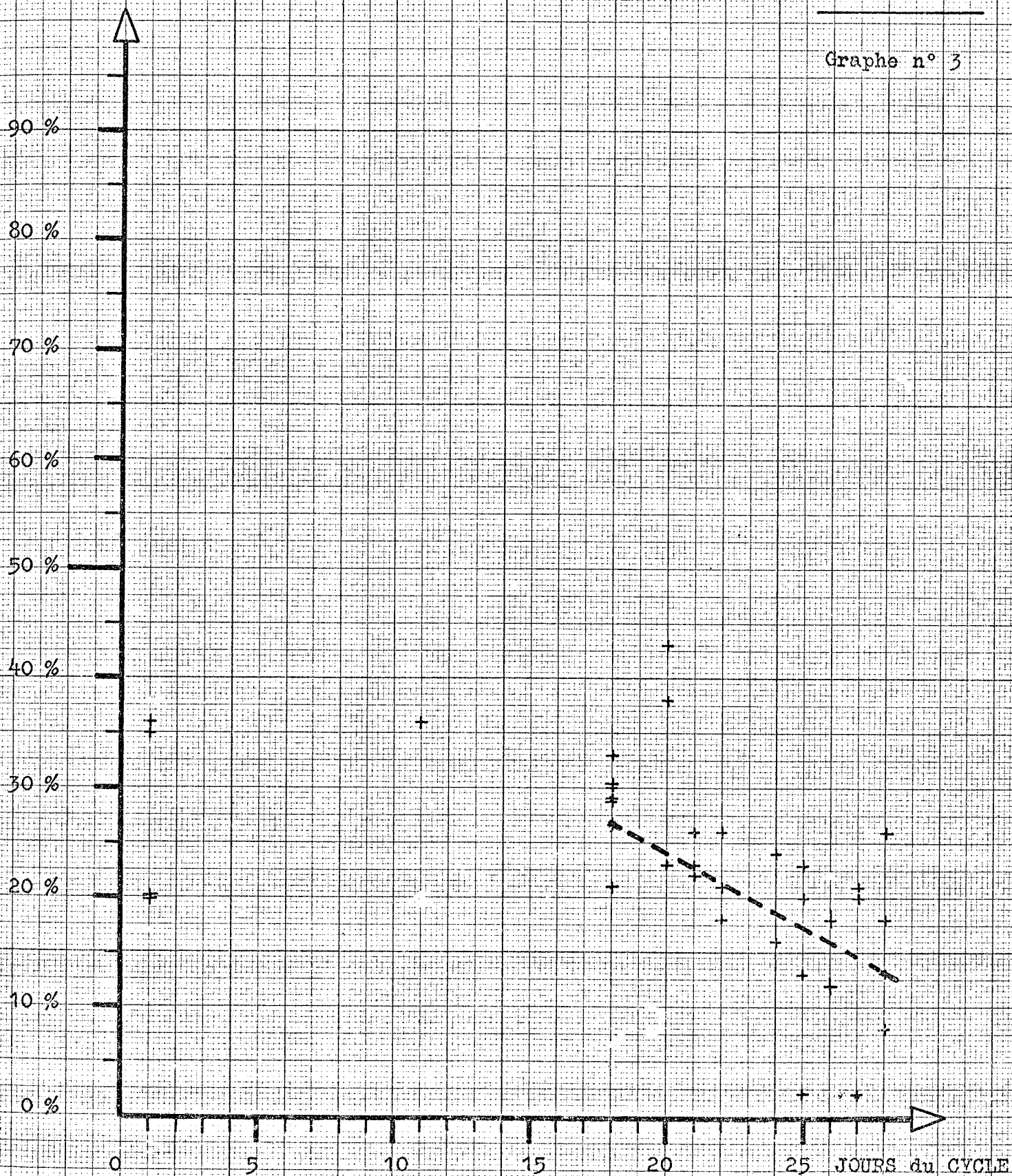


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

34 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 3

Pourcentage de
la fraction III

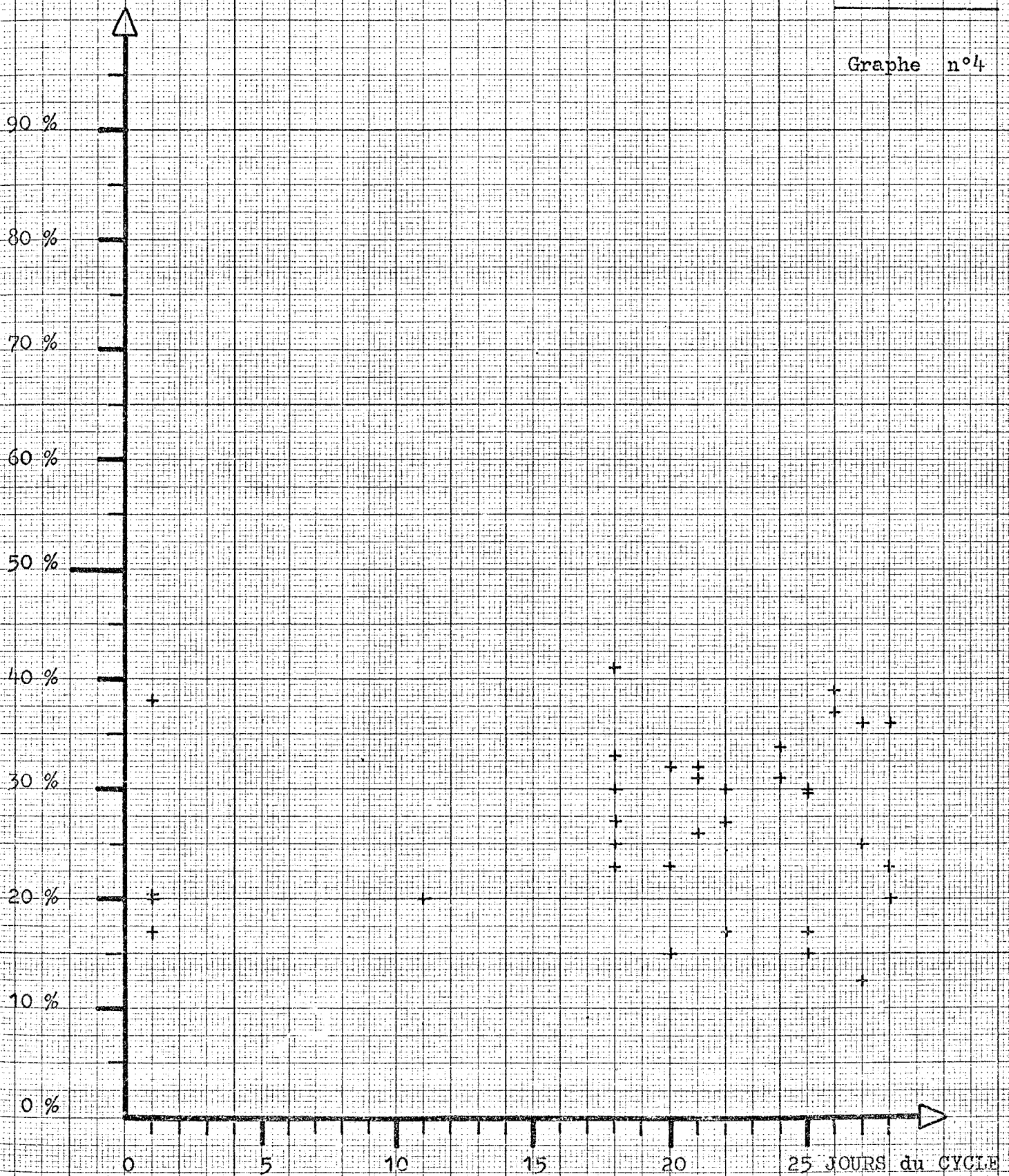


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n°4

Pourcentage de
la fraction IV

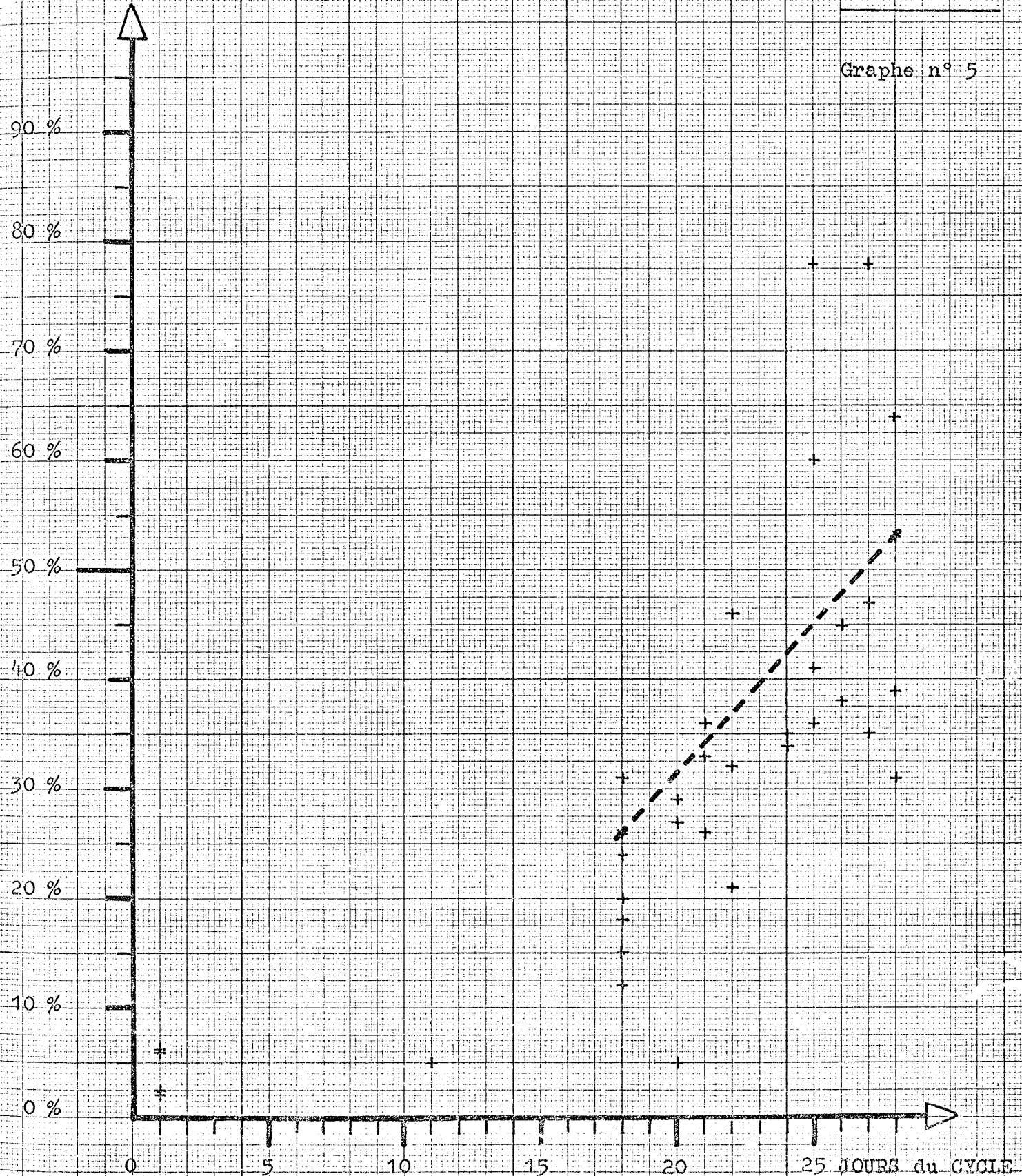


L. D. H. ISOENEYMATIQUES

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 5

Pourcentage de
La fraction V



Cependant les fractions II, III, V, ont des graphes tels qu'il nous a semblé possible de faire un ajustement au sens des moindres carrés, mais ceci seulement sur l'intervalle 18-28, car il y a trop peu de points avant le 18e jour.

Les résultats sont représentés par les segments de droite tracés sur les graphes ci-dessus cités : ils permettent de donner une idée qualitative des phénomènes.

La seconde série de graphes comprend les graphes n° 6 à 15.

Les points correspondent aux rapports des pourcentages des différentes fractions.

Nous avons calculé les 10 rapports suivants :

$$\begin{array}{cccc} I/II & I/III & I/IV & I/V \\ & II/III & II/IV & II/V \\ & & III/IV & III/V \\ & & & IV/V \end{array}$$

ainsi que leurs inverses.

Nous n'avons tracé que les graphes des 10 séries de rapport ci-dessous, les autres n'apportant rien de plus.

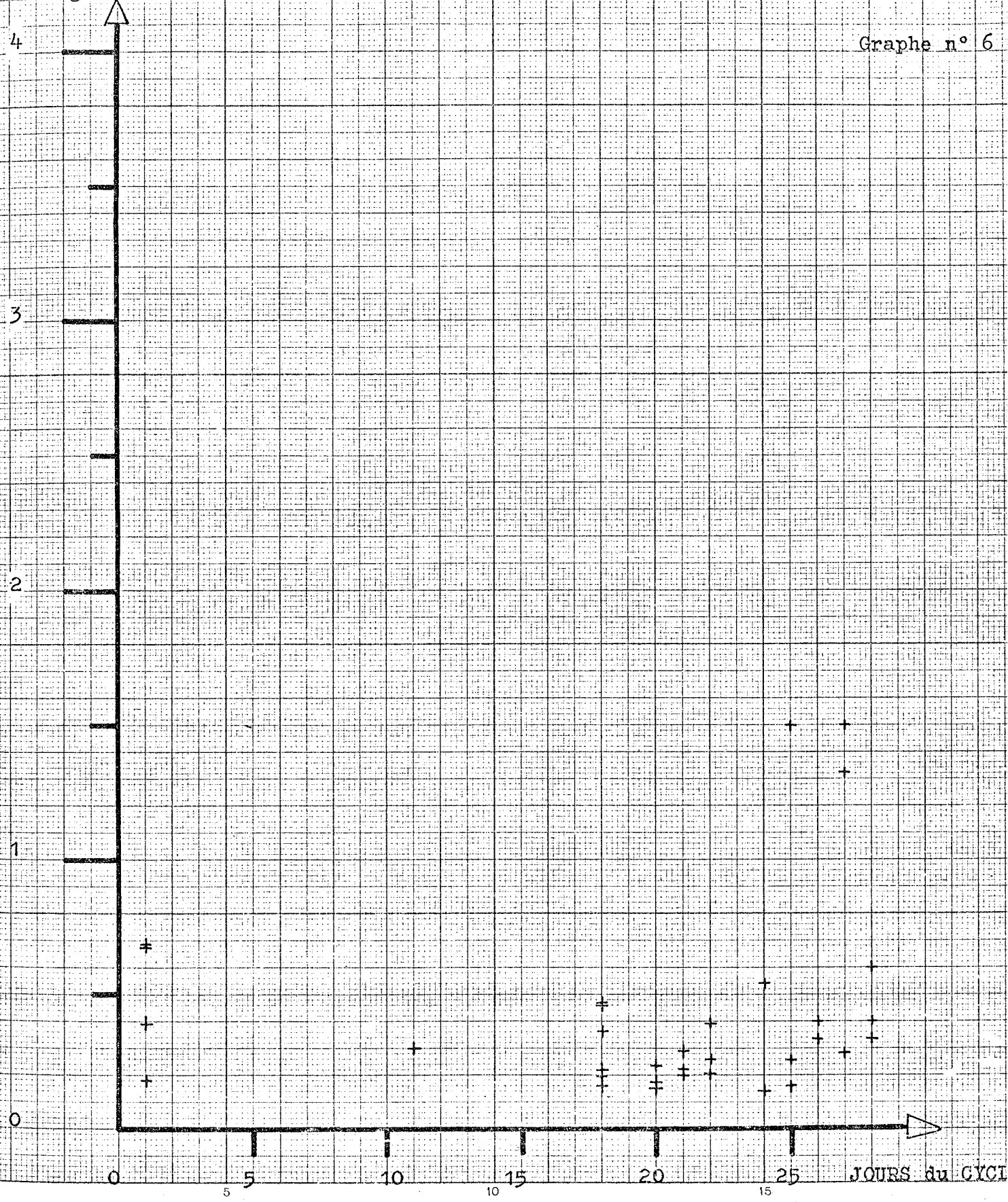
La dispersion est en effet telle qu'il ne nous a pas semblé intéressant de faire des ajustements au sens des moindres carrés.

L. D. H. ISOENZYMATIQUES

Rapport du pourcentage
de la fraction I au pourcentage de la fraction II

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

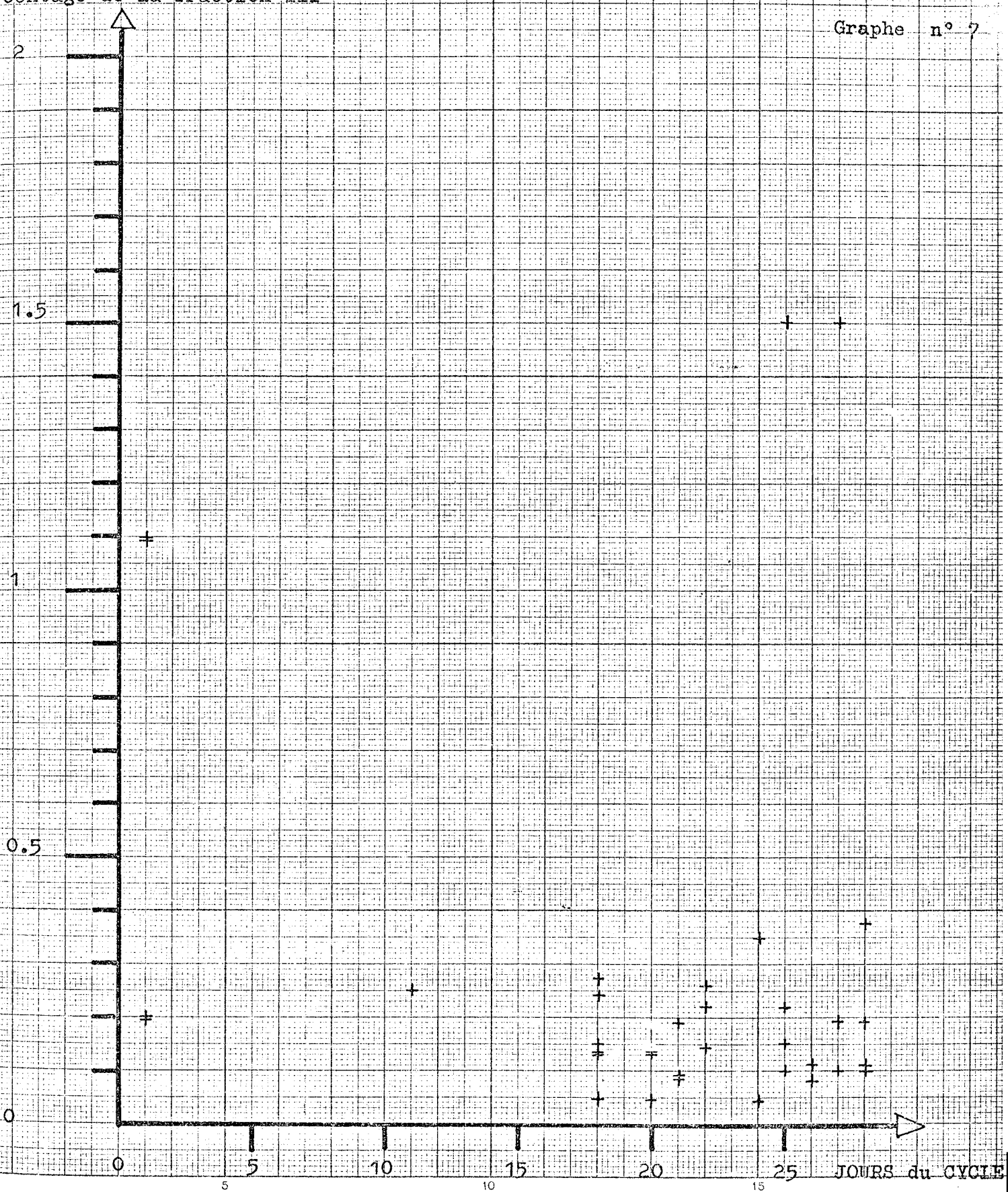
Graphe n° 6



Rapport du pourcentage
de la fraction I au pour-
centage de la fraction III

34 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 7



L. D. H. ISOENZYMATIQUES

+ Rapport du pourcentage
de la fraction I au pour
centage de la fraction IV

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 8

1.0

0.5

0

0

5

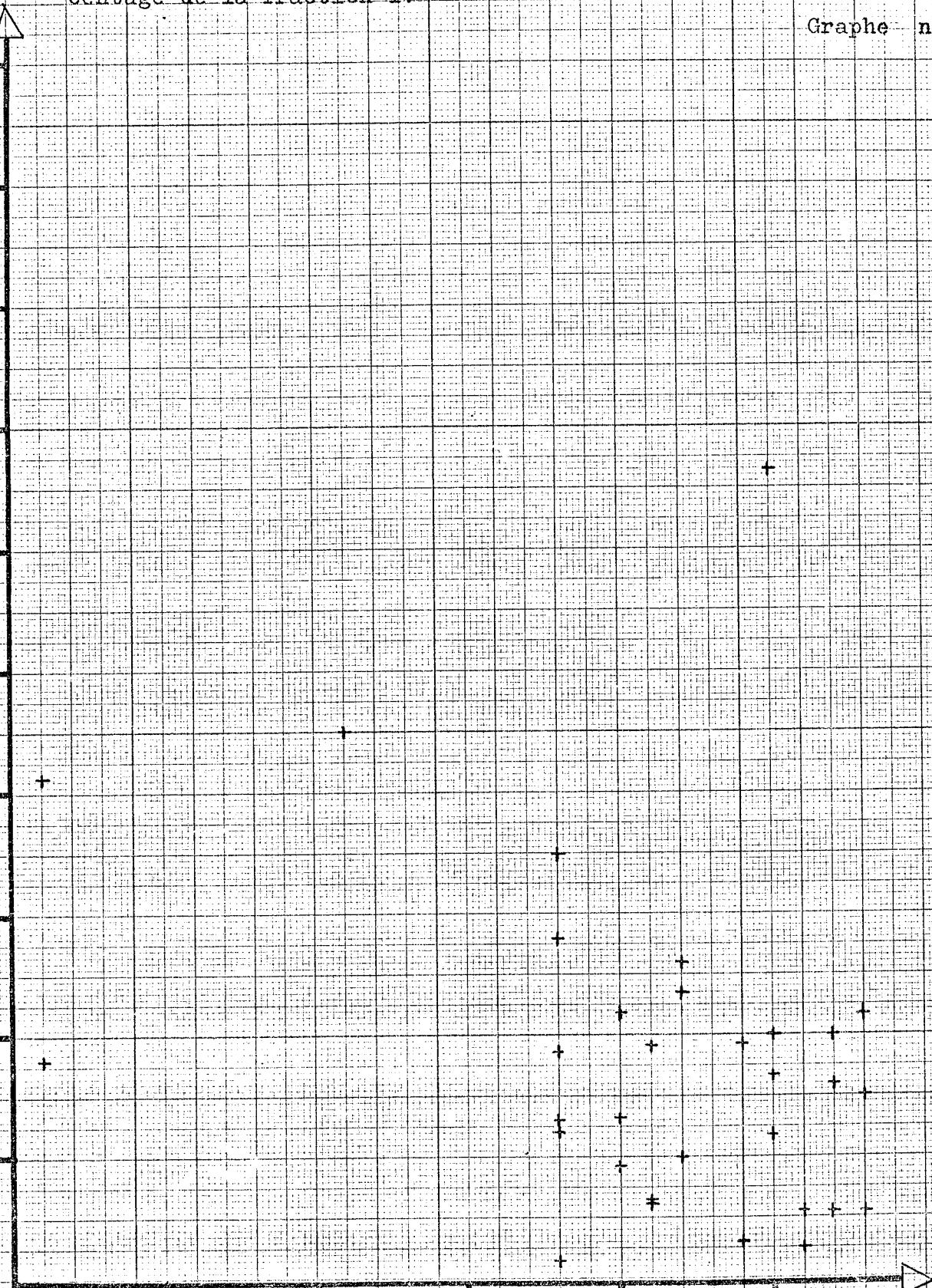
10

15

20

25

JOURS du CYCLE

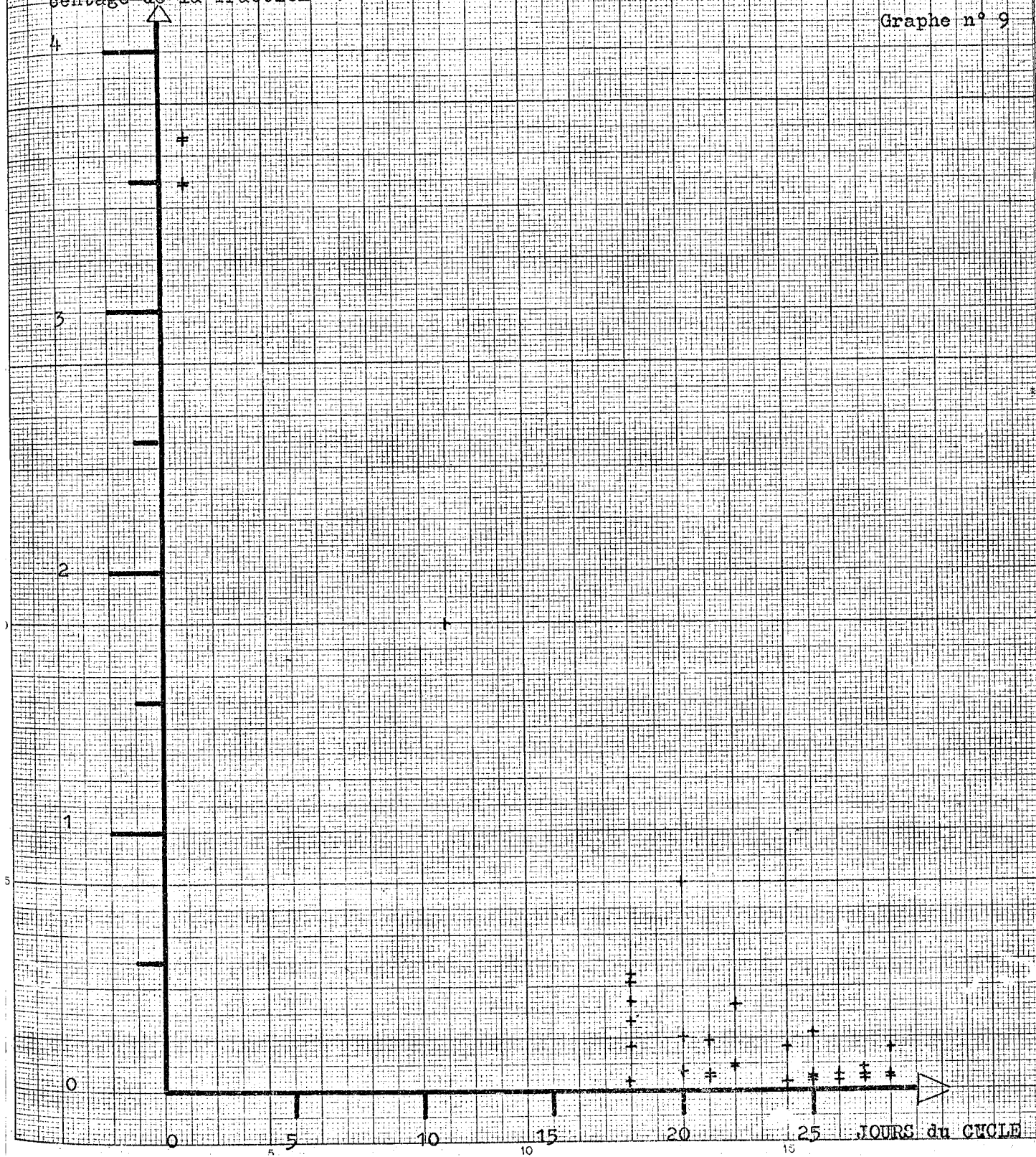


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

Rapport du pourcentage
de la fraction I au pour-
centage de la fraction V

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 9

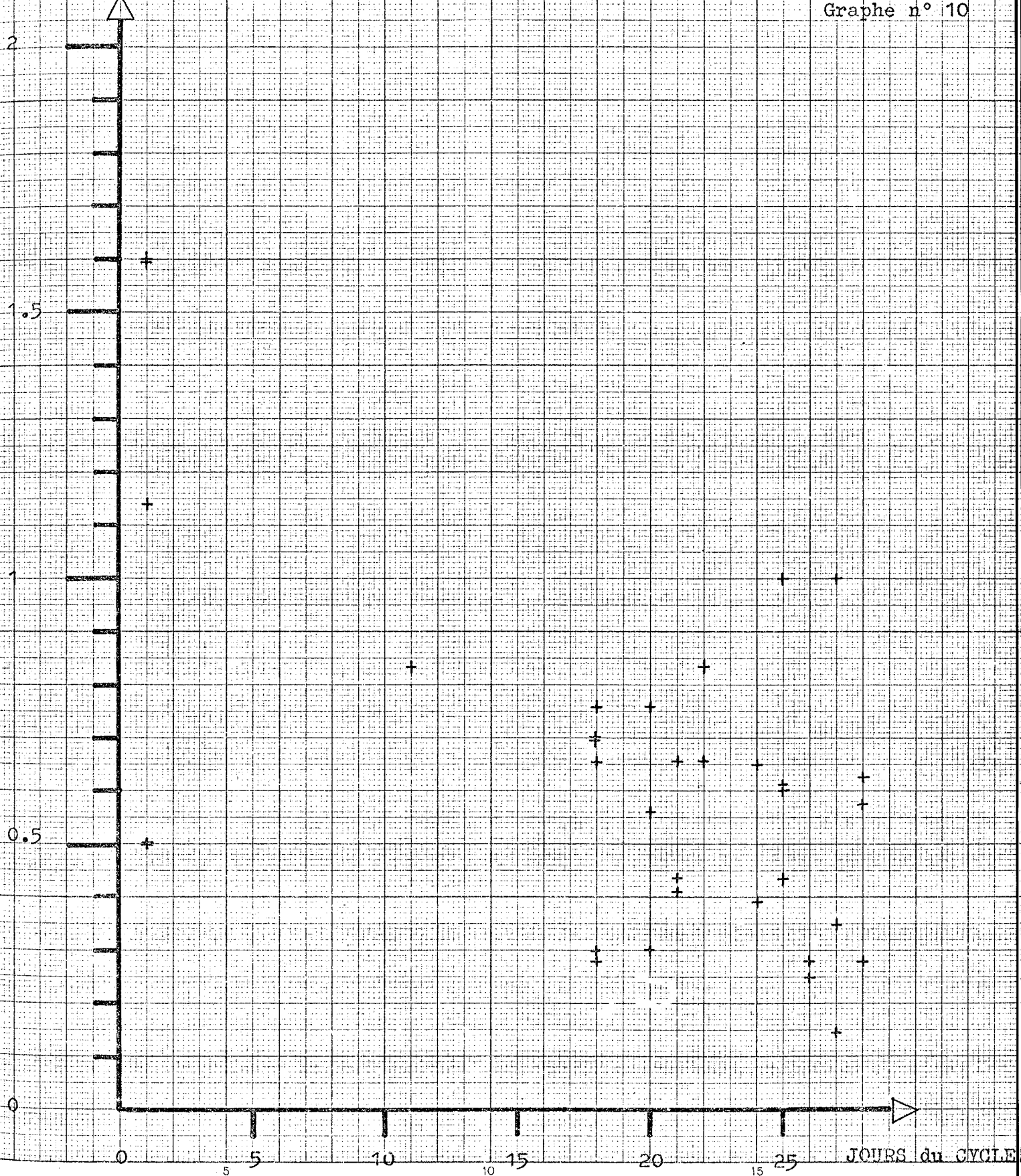


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 10

Rapport du pourcentage
de la fraction II au pour
centage de la fraction III

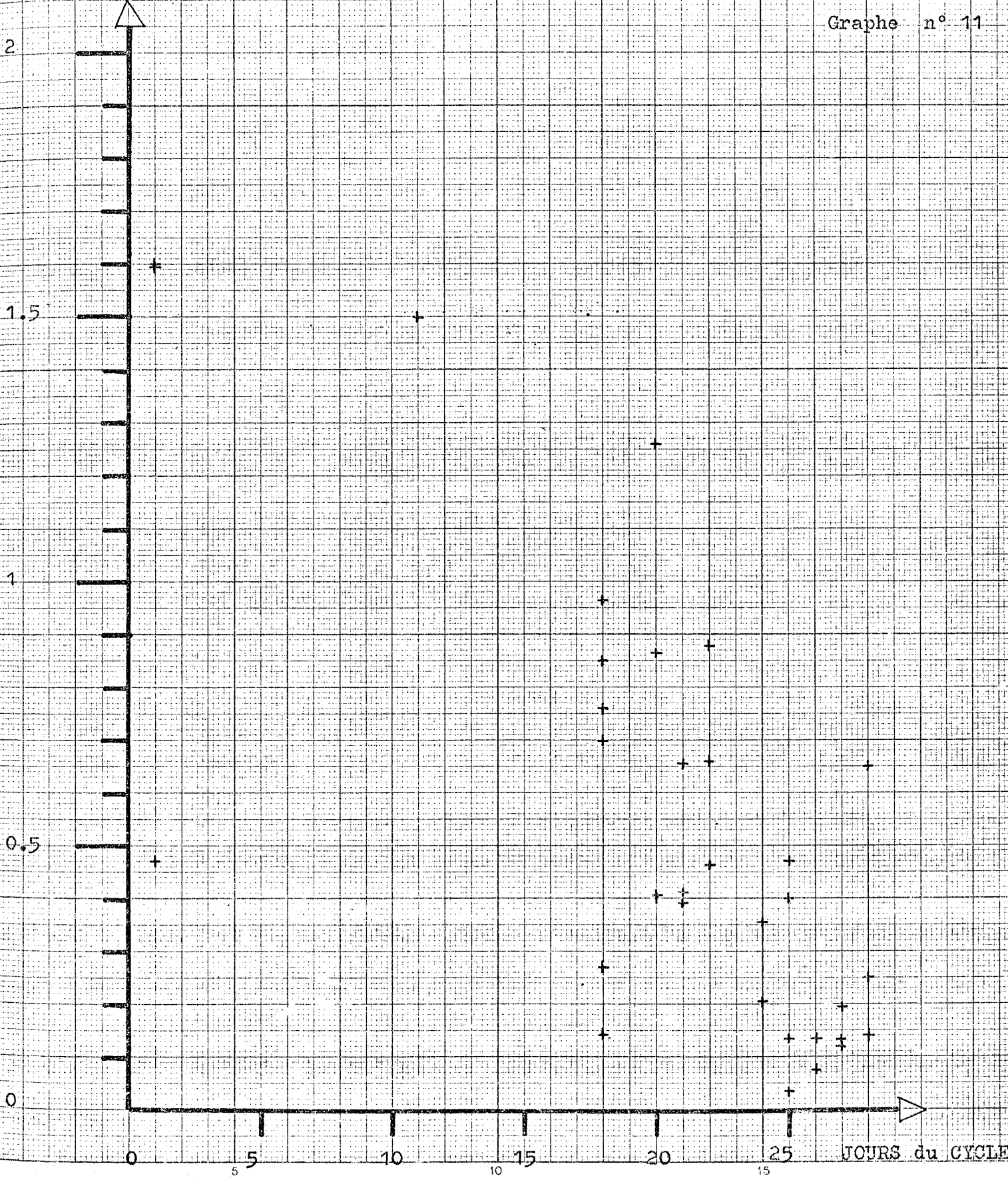


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

Rapport du pourcentage
de la fraction II au pour-
centage de la fraction IV

3.4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 11

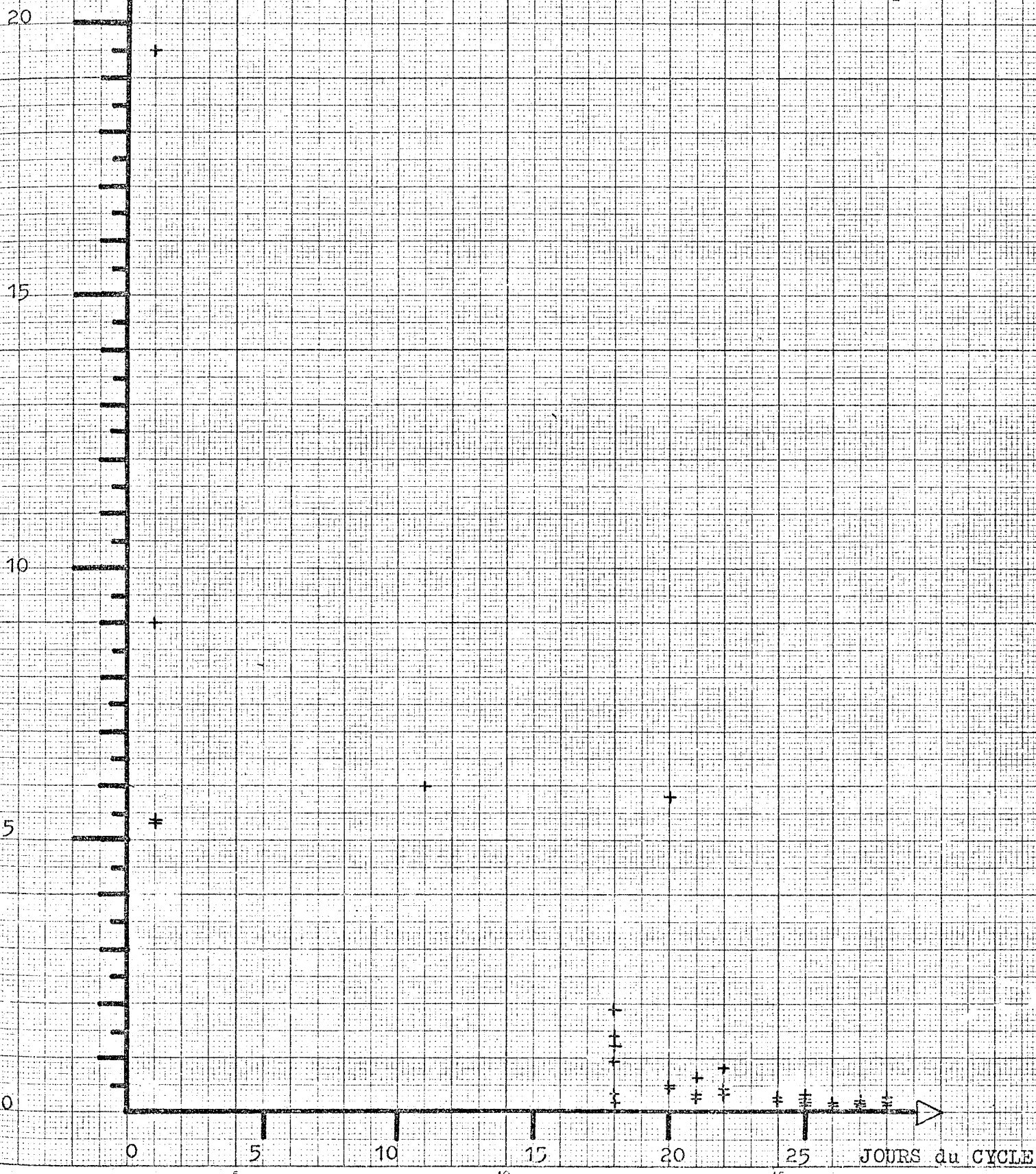


L. D. H. I S O E N Z Y M A T I Q U E S

Rapport du pourcentage
de la fraction II au pourcentage de la fraction V

3.4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 12

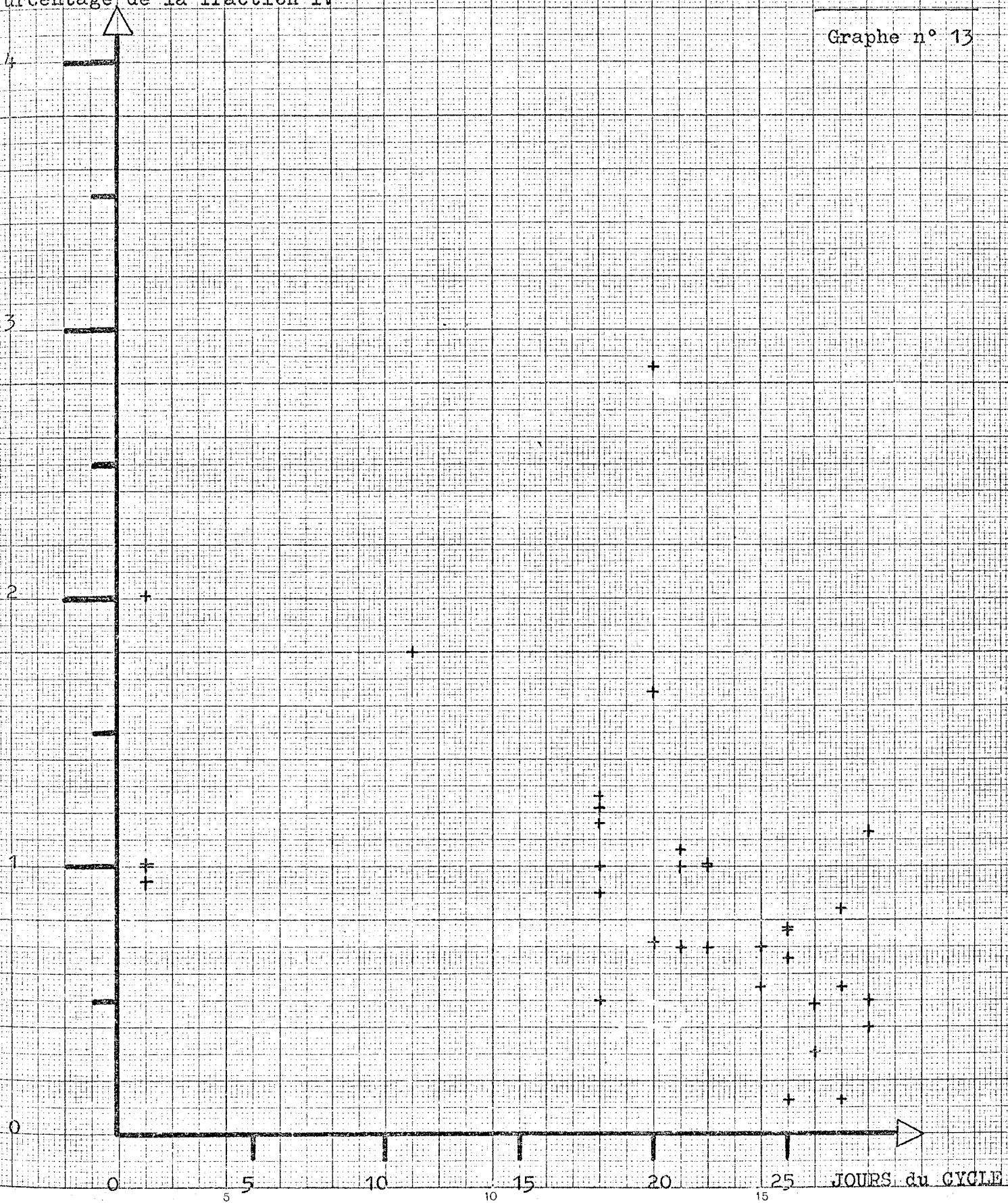


L. D. H. I S O E N Z Y M A T I Q U E S

Rapport du pourcentage
de la fraction III au po
urcentage de la fraction IV

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n° 13

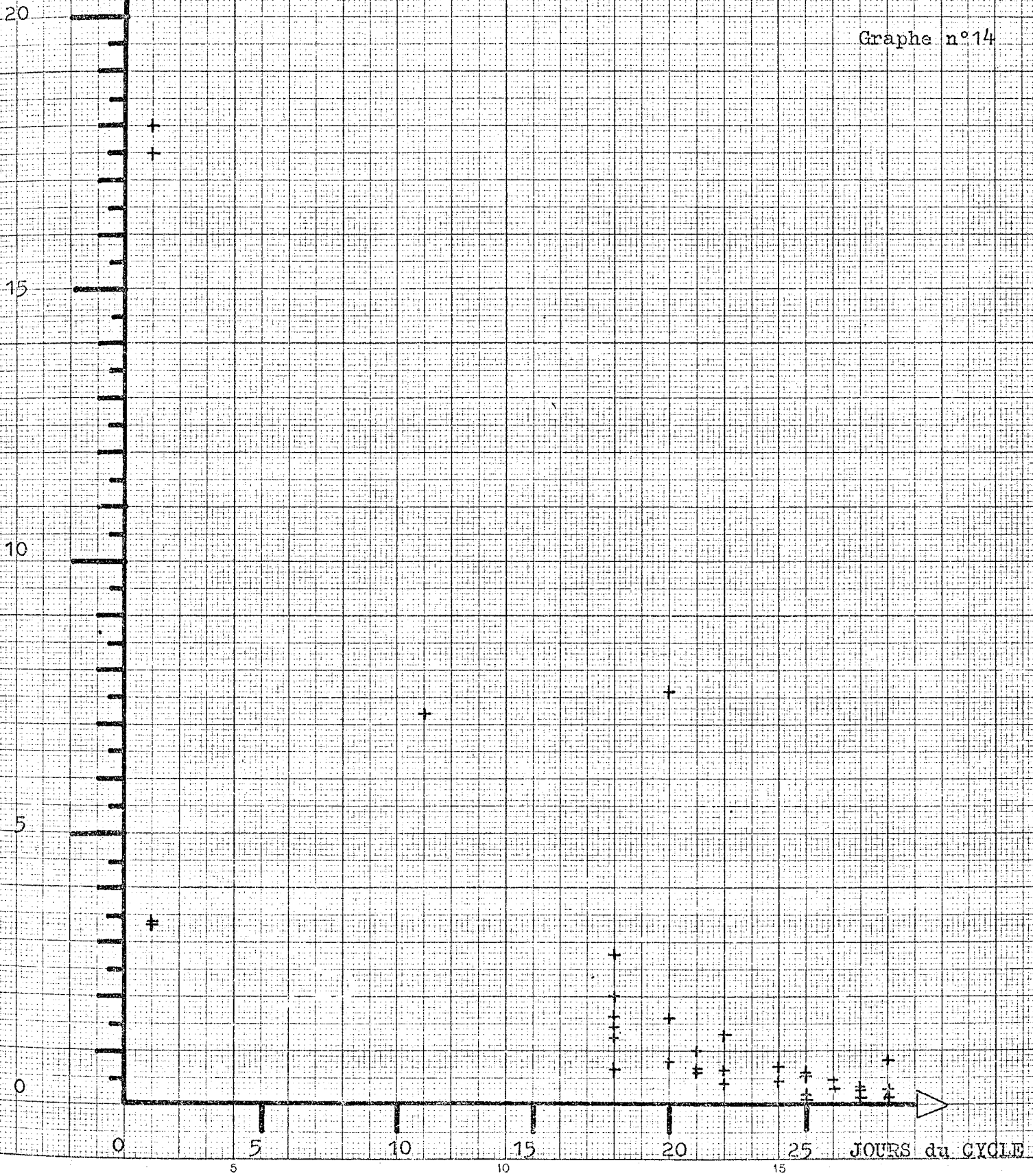


L. D. H. I S O E N Z Y M A T I Q U E S

Rapport du pourcentage
de la fraction III au po-
urcentage de la fraction V

3 4 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n°14

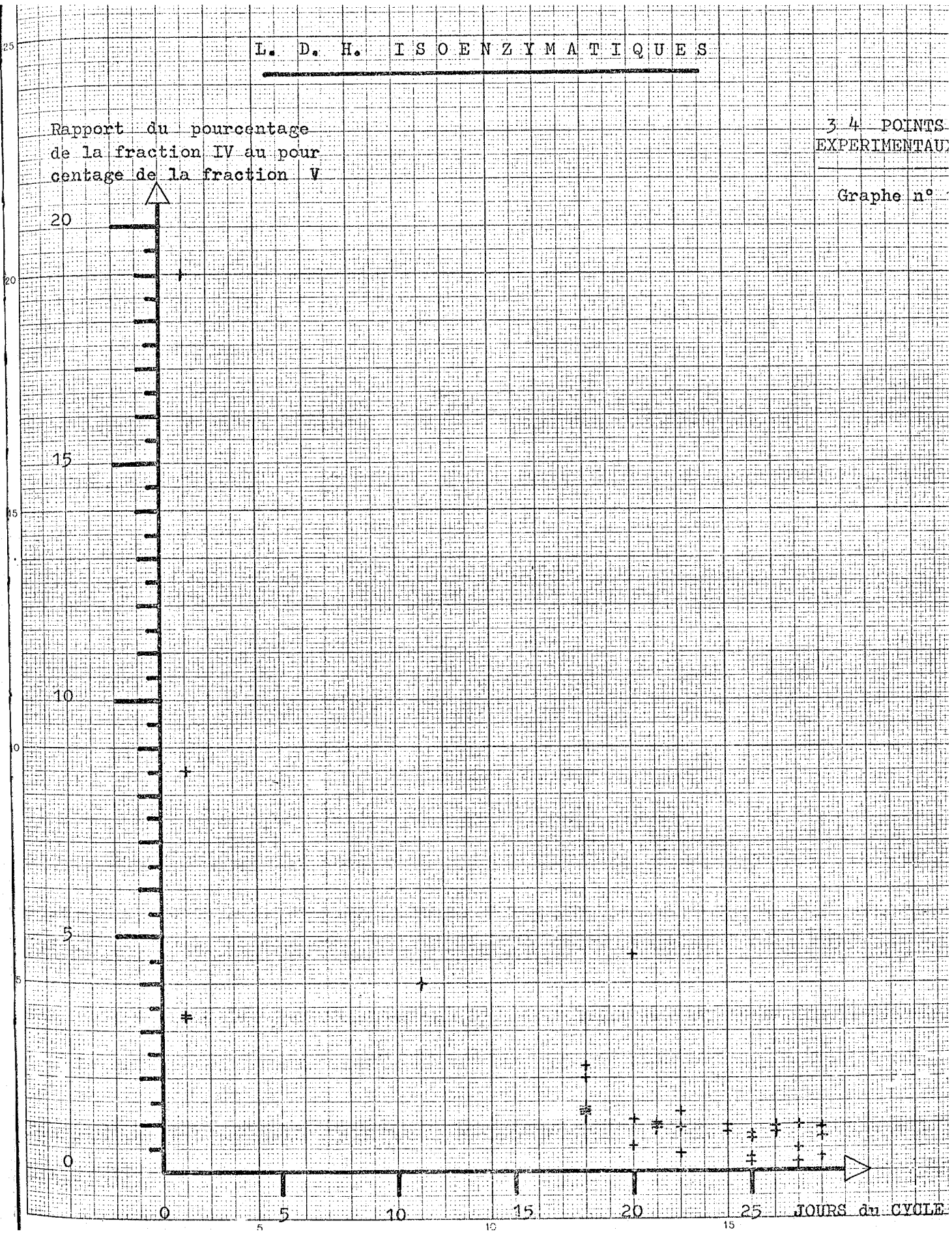


L. D. H. ISOENZYMATIQUES

Rapport du pourcentage
de la fraction IV au pour-
centage de la fraction V

34 POINTS
EXPERIMENTAUX

Graphe n°



Rapports de la fraction I aux
fractions II III IV V

date histologique	I / II	I / III	I / IV	I / V
1	0.1794	0.1944	0.1842	3.5000
1	0.3888	0.2000	0.4117	3.5000
1	0.6875	1.1000	1.1000	3.6666
1	0.6875	1.1000	1.1000	3.6666
11	0.3000	0.2500	0.4499	1.8000
18	0.1666	0.0476	0.0243	0.0322
18	0.1904	0.1333	0.1212	0.1666
18	0.2173	0.1333	0.1333	0.2666
18	0.3636	0.1515	0.1851	0.3500
18	0.3684	0.2413	0.2799	0.4166
18	0.4444	0.2758	0.3478	0.4444
20	0.1538	0.0465	0.0937	0.0740
20	0.1724	0.1304	0.1333	0.1034
20	0.2307	0.1315	0.2173	1.0000
21	0.2000	0.0869	0.0625	0.0555
21	0.2222	0.0909	0.0645	0.0606
21	0.2941	0.1923	0.1923	0.1923
22	0.2142	0.1428	0.1000	0.0869
22	0.2666	0.2222	0.2352	0.0937
22	0.3888	0.2592	0.2592	0.3333
24	0.1428	0.0416	0.0294	0.0294
24	0.5454	0.3529	0.1935	0.1714
25	0.1666	0.1000	0.1176	0.0333
25	0.2500	0.1538	0.1666	0.0384
25	1.5000	0.2173	0.2000	0.0555
25	5.0000	1.5000	0.6666	0.1219
26	0.3333	0.0833	0.0256	0.0222
26	0.4000	0.1111	0.0540	0.0526
27	0.2857	0.1000	0.0555	0.0384
27	1.3333	0.1904	0.1599	0.0571
27	1.5000	1.5000	0.2000	0.0851
28	0.3333	0.1111	0.0555	0.0468
28	0.4000	0.1923	0.1500	0.0512
28	0.6000	0.3750	0.2173	0.1612

Rapports de la fraction II aux
fractions III IV V

date histologique	II / III	II / IV	II / V
1	0.5000	0.4736	5.3333
1	1.1142	1.6000	5.3333
1	1.6000	1.6000	9.0000
1	1.6000	2.2941	19.5000
11	0.8333	1.5000	6.0000
18	0.2857	0.1463	0.1935
18	0.3000	0.2727	0.3750
18	0.6551	0.7000	0.9500
18	0.6969	0.7600	1.2222
18	0.7000	0.8518	1.4000
18	0.7586	0.9565	1.9166
20	0.3023	0.4062	0.4482
20	0.5652	0.8666	0.4814
20	0.7631	1.2608	5.8000
21	0.4090	0.2903	0.2500
21	0.4347	0.3125	0.3030
21	0.6538	0.6538	0.6538
22	0.6666	0.4666	0.3260
22	0.6666	0.6666	0.4375
22	0.8333	0.8823	0.8571
24	0.2916	0.2058	0.2058
24	0.6470	0.3548	0.3142
25	0.0434	0.0333	0.0256
25	0.6000	0.1333	0.0243
25	0.6153	0.4000	0.1333
25	1.0000	0.4705	0.3333
26	0.2500	0.0769	0.0666
26	0.2777	0.1351	0.1315
27	0.1428	0.1200	0.0256
27	0.3500	0.1944	0.0638
27	1.0000	0.1333	0.2000
28	0.2777	0.1388	0.0781
28	0.5769	0.2500	0.1282
28	0.6250	0.6521	0.4838

Rapports de la fraction III
aux fractions IV et V

date histologique	III / IV	III / V
1	0.9473	3.3333
1	1.0000	3.3333
1	1.0000	17.5000
1	2.0588	18.0000
11	1.8000	7.2000
18	0.5121	0.6774
18	0.9090	1.2500
18	1.0000	1.4500
18	1.1600	1.6111
18	1.2222	2.0000
18	1.2608	2.7500
20	0.7187	0.7931
20	1.6521	1.5925
20	2.8666	7.6000
21	0.7096	0.6111
21	0.7187	0.6969
21	1.0000	1.0000
22	0.7000	0.3913
22	1.0000	0.6562
22	1.0588	1.2857
24	0.5483	0.4857
24	0.7058	0.7258
25	0.1333	0.0256
25	0.6666	0.2166
25	0.7647	0.5555
25	0.7666	0.5609
26	0.3076	0.2666
26	0.4864	0.4736
27	0.1333	0.0256
27	0.8400	0.4468
27	0.5555	0.5714
28	0.4000	0.1250
28	0.5000	0.4615
28	1.1304	0.8387

Rapports de la fraction
IV à la fraction V

date histologique	IV / V
1	3.3333
1	3.3333
1	8.5000
1	19.0000
11	4.0000
18	1.2500
18	1.2777
18	1.3225
18	1.3750
18	2.0000
18	2.2500
20	0.5555
20	1.1034
20	4.6000
21	0.8611
21	0.9696
21	1.0000
22	0.3695
22	0.9375
22	1.2857
24	0.8857
24	1.0000
25	0.1923
25	0.2833
25	0.7317
25	0.8333
26	0.8666
26	0.9736
27	0.1923
27	0.5319
27	1.0285
28	0.3125
28	0.7419
28	0.9230

En résumé, nous dirons que le nombre des mesures par trop insuffisant ne permet pas d'obtenir des résultats convenables.

Des travaux ultérieurs devront s'attacher à réaliser un nombre plus important de prélèvements afin d'être en possession d'une répartition plus homogène des dates histologiques.

C O N C L U S I O N S

L'activité enzymatique de l'endomètre ouvre des perspectives nouvelles.

1 - Dans une première partie, nous complétons et précisons des recherches antérieures sur la PHOSPHATASE ALCALINE : thèse présentée le 15 Mai 1968 par Monsieur MAUREL Claude (N° d'ordre 16) à la Faculté de Médecine de GRENOBLE.

Nos travaux ont porté sur 154 observations (58 dans la thèse de Monsieur MAUREL).

La phosphatase alcaline peut-être considérée comme un témoin de la synthèse protéique induite par les oestrogènes. L'histologie a permis d'affecter une date précise à chaque biopsie reclassée dans un cycle idéal de 28 jours.

a) - Variations du taux histochimique de la phosphatase alcaline au cours du cycle, - au niveau de deux localisations préférentielles : les vaisseaux et les glandes de l'endomètre.-

Ce taux augmente pendant toute la durée d'action des oestrogènes. Il atteint dans les vaisseaux un premier maximum pré-ovulatoire. Un deuxième maximum coïncide avec la période de pleine activité du corps jaune et est suivi d'une chute progressive. Dans les glandes de l'endomètre on observe un seul maximum à la période préovulatoire suivi d'une chute plus rapide.

Dans les deux localisations qui ont fait l'objet de notre étude, l'apparition des règles (arrêt brutal de la sécrétion oestrogénique) coïncide avec la disparition de la phosphatase alcaline. Son activité reprend avant la fin des règles.

L'histochimie montre donc, sinon une concordance, du moins une évolution parallèle du taux de la phosphatase alcaline endométriale au cours du cycle menstruel normal et de l'activité des oestrogènes reconnue grâce aux variations classiques de l'aspect histologique.

b) - Variations du taux biochimique de la phosphatase alcaline en fonction du temps au cours d'un cycle menstruel normal.

Technique :

Taux obtenu par le dosage du paranitrophényl-phosphate libéré à partir du paranitrophénol à 37°, en 10 mn et par mg de protéine.

Notre effort a porté sur un nombre important de calculs mathématiques.

L'analyse des points a été traitée par calculateur I.B.M. 7044. La droite d'ajustement au sens des moindres carrés ne passe pas par l'origine contrairement à ce qui avait été supposé ; en effet la parabole n'a pas son minimum au 28e jour, mais à une date antérieure.

2 - L'étude de la LACTATE DESHYDROGENASE endométriale et de ses ISOENZYMES constitue une deuxième voie de recherche qui paraît riche en promesses. Nous présentons 92 observations pour la L.D.H. globale et 34 points expérimentaux pour la détermination électrophorétique des cinq fractions isoenzymatiques.

a) - Variations du taux biochimique de la lactate deshydrogénase globale en fonction du temps au cours d'un cycle menstruel normal (taux exprimé en millimicromoles de N A D H par mn et par mg de protéine).

L'ajustement des 92 points expérimentaux au sens des moindres carrés peut s'exprimer aussi bien par une droite (fonction croissante dans la première moitié du cycle) que par une parabole (qui indiquerait une décroissance en fin de cycle). Seule l'étude sur ordinateur (I.B.M. 7044) nous a permis d'obtenir une solution valable, premier jalon d'études à venir.

b) - Les isoenzymes de la lactate deshydrogénase

Pour une meilleure compréhension de la dépendance hormonale de la synthèse de la lactate deshydrogénase, nous avons cherché à déterminer l'isozymogramme de l'endomètre et à savoir s'il était possible de penser qu'en fonction des variations

cycliques de ce dernier, il pourrait exister une différence dans la distribution des isoenzymes.

Résultats :

- Présentation de l'isoenzymogramme de la L.D.H. endométriale à partir de 34 biopsies.
- Variations des fractions isoenzymatiques au cours du cycle :
 - première phase du cycle
 - proliférative
 - contrôle des oestrogènes : concentration maximum en isoenzymes I, II, III.
 - deuxième phase
 - secrétoire
 - stimulation oestrogénique et progestérone : concentration maximum III, IV, V
- Il est possible de suggérer à la suite de nos constatations que dans la dernière phase, secrétoire endométriale, la glycolyse anaérobie est plus active qu'en phase de prolifération. ceci n'implique pas que la présence ou l'absence d'une hormone particulière (oestrogène ou progestérone) soit importante, mais cela reflète l'activité métabolique à l'intérieur d'un tissu à un temps donné, en fonction d'un certain stimulus.
- L'étude mathématique nous amène une fois de plus à considérer notre travail comme une voie ouverte à des travaux ultérieurs, tout à fait dignes d'intérêt.

La confrontation de nos résultats tant histologiques qu'histochimiques et biochimiques, l'étude d'autres enzymes (anhydrase carbonique, carboxylases) selon ces méthodes, apporteront des précisions supplémentaires : le dosage biochimique permettant de connaître le degré de la stimulation oestrogénique de l'endomètre, l'histochimie et l'histologie déterminant le lieu et la date de cette stimulation.

Vu, le Doyen :

G. CABANEL

Le Président de la Thèse

Y. MALINAS

Vu et permis d'imprimer
GRENOBLE, le 4 Juin 1971

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

- 1 - APPELLA E. et MARKERT C.L.
 Biochem. Biophys. Research comm 1961, 6, 171
- 2 - ARMBORST V. et SCHMOKER
 The isoenzymes of lactate dehydrogenase in the
 human uterus and ovary
 Z bi Gynäck 1968, 90, 1753-64
- 3 - ARVY L.
 Les techniques actuelles d'histoenzymologie
 Biologie médicale
 1958 Tome XLVII (Specia) 142-186]
- 4 - ATKINSON W.M.B. and GUSBERG S.B.
 Histochemical studies on abnormal growth of human
 endometrium
 Cancer , NEW-YORK 1948, 1, n° 2, 248, 251
- 5 - BÄR U., SCHMIDT E. et SCHMIDT F.W.
 Klin. Wschr 1963, 41
- 6 - BARBOUR E.M.
 Histochemical change in endometrium
 Normal endometrium
 J.Obst. Gyn. Brit. Comm. 1961, 68, 662-667
- 7 - BODANSKI A.
 J. Biol. Chem. 1933, 101, 93-104
- 8 - BONAVITA V., AMORE G., AVELLONES et GUARNERI.R.
 J. Neurochem. 1965, 12, 37
- 9 - BOUTSELIS J.G., DENEFF J.C., ULLERY J.C. et OVERDOT G.
 Obstet. Gynecol. 1963, 21, 423
- 10 - BRODY I.A.
 1964, 14, 1091
- 11 - BRUX J. (De) et DUPRE-FROMENT J.
 Evaluation de l'activité ovarienne par l'étude con-
 jointe des biopsies d'endomètre et des cycles de
 frottis vaginaux
 Arch. Anat. Path. 1964, 12, 58-63
- 12 - BRUYET et Collab.
 Ann. Biol. clin. 1958. XVI, 10+12. 661-668

- 13 - CAHN R.D., KAPLAN N.O., LEVINE L. et ZWILLING E.
Science (WASHINGTON) 1962, 136, 962
- 14 - COURTOIS J.E.
Ann. Biol. Clin. 1959. 17, 10-12, 551-558
- 15 - DAVIDSON E.H.
Hormones and genes
Scient. American. 1965, 212/6, 36-45
- 16 - DAWSON D.M., GOODFRIEND T.L. et KAPLAN N.O.
Science 1964, 143, 929
- 17 - DELARUE J.
Technique et interprétation des biopsies d'endomètre
pendant le cycle menstruel
Gynéc. Prat. ;1960, 1, 39
- 18 - DENIS L.J., PROUT G.R. Jr, et Van SANDE M.
J.A.M.A. 1961, 178, 1093
- 19 - DENIS L.J., PROUT G.R. Jr.
Surg. Forum 1962, 13, 515
- 20 - DENIS L.J., PROUT G.R. Jr, Van SANDE M. et Van CAMP K.
J. Urol. 1962, 88, 77
- 21 - DENIS L.J.; PROUT G.R.Jr.
Invest. Urol. 1963, 1, 101
- 22 - DIRSCHEL W., SCHRIEFERSH, BREUER H
Action of steroid Hormones on glycolysis and aldolase
activity of the uterus of normal and castrate rats
Acta. Endocrinol. 1955; 20, 181-186
- 23 - DRASHER M.L.
Morphological and chemical observations on the
mouse uterus during the estrous cycle and under hor-
monal treatment
J. Exp.^{tl} Zool 1957, 119, 333-337
- 24 - EMERY A.E.H.
Nature 1964, 201, 1044

- 25 - EMERY A.E.H.
Biochem. J. 1967, 105, 599
- 26 - ERICKSON R.J., et MORALES B.S.
New England J. Med. 1961, 265, 478-531
- 27 - FAUVERT R. et HARTMANN L.
Techniques modernes de laboratoire
Expansion scientifique éd. PARIS 1961-1962
- 28 - FINE I.H. et COSTELLO L.A., COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O.
Methods in enzymology
Academie Press, NEW-YORK;1963, Vol. 6, 958
- 29 - FISHMANN W.H., LERNER F.
J. Biol. chem. 1953, 200, 89
- 30 - FONTY P., LEDUC C., VERNIN H.
Ann. Biol. clin. 1962, 20, 719, 617-641
- 31 - FONTY P.
Ann. Biol. clin. 1964, 22, 5.6, 650
- 32 - FOTTRELL P.F., CARMEL Sr, SPELLMAN M., O' DWYER E.
Clin. chim. Acta 1969, 26, 584-585
- 33 - FRITZ J. et JACOBSON K.B.
Science 1963, 140, 64
- 34 - GALBRAITH H. et al.
Changes in the proportion of H and M subunits of
lactate dehydrogenase in rat uterus during an
oestrous cycle
Biochem. Biophys. Acta 1970, 201, 391-393
- 35 - GAUTRAY J.P, CHAMBAZ Ed. , DARBEL A., LEGER P.
Reproduction humaine - Aspects actuels de biologie
clinique -;1968 1 vol. Masson Ed. PARIS

- 36 - GEYER H., RIEBSCHLÄGER M.
Hormonwirkung auf cytoplasmatische und mitochondriale Enzyme in Uterus
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 1969, 350, 1172
- 37 - GEYER H. HEIL P.
Die Zyklusabhängigkeit der lactat Dehydrogenase in menschlichen Uterusmuskel
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 1970, 351, 891-892
- 38 - GEYER H.
Effect of pregnancy on the lactate dehydrogenase isoenzymes of the human uterine muscle
Klin - Wschr 1968, 46, 389-390
390-391
443-445
- 39 - GIBSON C. et al.
Oviducal lactate dehydrogenase
J. Reprod. Fertil. 1970, 22, 157-159
- 40 - GOLDMAN R.D.; KAPLAN N.O., HALL T.C.
Cancer Research 1964, 24, 389
- 41 - GOMORI G.
Microtechnical demonstration of P.A. in tissue sections
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939, 42, 23-26
- 42 - GOODFRIEND T.L., KAPLAN N.O.
J. Biol Chemistry 1964, 239, 130
- 43 - GOODFRIEND T.L., KAPLAN N.O.
Circulation 1965, 32, 1010-
- 44 - GOODFRIEND T.L., SOKOL. D.M., KAPLAN N.O.
J. Mol. 1966, 15, 18
- 45 - GORSKI J., NICOLETTE J.A.
Early estrogen effects on newly synthesized R.N.A. and phospholipid in subcellular fractions of rat uteri.
Arch. Biochem. Biophys. 1963, 103, 418-423

- 46 - GORSKI J.
Early estrogen effects on the activity of uterine
ribonucleic acid polymerase
J. Biol. chem. 1964, 239, 889-892
- 47 - GORSKI J. et AXMAN S.M.C.
Cycloheximide (actidione) inhibition of protein
synthesis and the uterine response to estrogen
Arch. Biochem. Bioph. 1964, 105, 517-520
- 48 - GROSS S.J.
Histochemistry of normal and abnormal endometrium
Am. J. Obst. Gyn. 1964, 88, n° 5 647-666
- 49 - GUTMAN A., GUTMAN E.
J. Clin. invest 1938, 17, 473
- 50 - HAYASHI M., SHIMODA K., OGADA K., TAKAWARE T.,
SHIRROGAWA T., KAWASE O.
Acta Histochem 1957, 3, 277
- 51 - HELM H.J., VAN DER.
Clini. chim. Acta 1962, 7, 124
- 52 - P. KARLSON
Hormones and gene action.
In : Techniques in endocrine research, by P. ECKSTEIN
and F. KNOWLES.
Academic press. London, N.Y. 1963
- 53 - KARMEN A., WROBLEWSKI F. LA DUE J.S.
J. Clin. invest. 1955, 34, 126
- 54 - KEARLY M.
Biochem. J. 1937, 31, 1544
- 55 - KING E.H., JEGATHEESAN K.A.
J. Clin. Path. 1959, 12, 85

56 - KLEIN B., READ P., BABSON A.L.

Clin. Chem. 1960, 6, 269-275

57 - LAFFARGUE P.

La biopsie d'endomètre en gynécologie
Gaz Méd. de France, 1966, 73, 1677-1685

58 - LEATHEN J.H.

Some biochemical aspects of the uterus
Annals N.Y. Acad. Sci. 1959, 75, (463-472)

59 - LEHMANN J. et LUH W.

Echantillons d'iso-enzymes de l'uterus de la rate -
1 étude comparative sur l'uterus non tratié.
Z. GEBURTSH. GYNÄK, déc. 1970; 173, n° 3, 330-338
7 fig. (Bibliogr.).

60 - LINDENSCHMIDT W. et ZEILE T.

Le comportement de l'aldolase et la dehydrogenase
lactique dans l'endomètre humain.
Zbl. Gyn. 21 av. 1962, 84, n° 16, 577-602; 15 fig.
3 tabl. (Bibliogra.)

61 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N., FARR A., RANDALL R.

J. Biol. Chem. 1951, 193, 265

62 - MANSOUR A.M., NIU M.C.

Functionnal studie with uterine R.N.A.
Proc. Nat. Sci. U.S.A. 1965 - 53, (764 - 770).

- 63 - MARKERT C., MOLLER F.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1959, 45, 753
- 64 - MCKAY D.G., HERTIG A.T., BARDAWIL W.A., VELARDO J.T.
Obstet. Gynec. 1956, 8, 22
- 65 - MINO M. et al.
Enzymatic developpement of The human fetus -
the isozyme of lactate dehydrogenase in the placenta
during gestation
- Acta Paediat Jap. 1968, 10, 1-5
- 66 - MITCHELL J.A. et YOCHIM J.M.
Endocrinology 1968, 83 701
- 67 - NACHLAS H.N., MARGULIES S.I., GOLDBERG.J.D.
SELIGMAN A.M.
Anal. Biochem. 1960, 1, 317
- 68 - W.D. NOTEBOOM, J. GORSKI
An early effect of estrogen on protein synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1963, 50, (250- 255)
- 69 - A. NOTIDES, J. GORSKI
Estrogen induced synthesis of a specific uterine portein
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1966, 56, (230-235)
- 70 - R.W. NOYES, A.T. HERTIG, J. ROCK
Dating the endometrial biopsy
Fertil. Steril. 1950, 1, (3-10).
- 71 - R.W. NOYES
Endometrical dating for the detection of ovulation
in OVULATION.
Edited by R.B. GREENBLATT, 1 vol., lippincott Gyn.
1966, (319-328).

72 - OKABE K.

Study of lactate dehydrogenase in the normal uterus and the uterine tumor tissues of humans

J. Jap. Biochem Soc. 1967, 39, 291-300

73 - PAGE E.W., GLENDINNING M.B., PARKINSON D.

Ann. J. Obst. Gynecol. 1951, 62, 1110

74 - PALMER R.

Les explorations fonctionnelles gynécologiques
Masson 1963

75 - PESCE A., MCKAY R.H., STOLZENBACH F., CAHN R.D.,
KAPLAN N.O.

J. Biol Chem. 1964, 239, 1953

76 - PELEIDERER G., MACHSMUTH E.D.

Klin. Wschr 1961, 39, 352

77 - PHILLIPE E., RITTER J., RENAUD R., GANDAR R.

Le cycle endométrial normal biphasique

Rev. Franç. Gynéco. Obst. 1965, 6, 405-424

78 - PLAGEMANN P. G.W., GREGORY K.F., WROBLEWSKI F.

J. Biol Chem. 1960, 235, 2238

79 - POLONOWSKI, BOULANGER

Enzymes et métabolisme
1960, 14, 238, 519

- 80 - PRESTON J.A., BRIERE R.O., BATSAKIS J.G.
Am. J. Clin. Path. 1965, 43, 256
- 81 - PULKKINEN et al.
Enzymes and isoenzymes in maternal and foetal sera -
A study on lactate and isocitrate dehydrogenase,
alkaline phosphatases and ~~Beta~~ ~~glucuronidase~~.
Acta Obstet. gynec. Scandinavia 1963, 47, 273-291
- 82 - REITMAN S., FRANKEL S.
Am. J. clin. Path. 1957, 28, 56
- 83 - RINGOIR S., WIEME R.J., REGNIERS P.
J. d'urolog. et de néphrol 1964, 70, 126
- 84 - RINGOIR S., WIEME R.J., REGNIERS P.
Proceedings E.D.T.A. Conference, Excerpta medica
foundation international congress series
1965 n° 103, 1 vol., 196
- 85 - RINGOIR S., WIEME R.J.
Lancet 1965, ii, 906
- 86 - RINGOIR S.
Société de néphrologie Nov. 1966
- 87 - RINGOIR S.
Isoenzymes de la lactate dehydrogenase
Gaz Med. de France 1967, Tome 74, n° 4
- 88 - RODDICK J.W., GORDON Jr. MD, ING K.C., BEAN MIDBOE B.S.
Isozyme de la dehydrogenase lactique dans l'endomètre
normal
Am. J. of Obst. and Gynec. 1966, vol. 95, n° 4,
459-461
- 89 - SALDARINI R.J., YOCHIM J.M.
ENDOCRINOLOGY 1967, 30, 453
- 90 - SAYRE F.W., HILL B.R.
Proc. Soc. exp. biol. (N. YORK) 1957, 96, 695
- 91 - SCHAPIRA G., DREYFUS J.C.
Comptes rend. séances Soc. Biol. 1958, 152, 1705

- 92 - SCHAPIRA G., DREYFUS J.C.
Europ. Symp. méd. Enzymol. Cr. 1961, 119
- 93 - SCHAPIRA G., DEMOS J.
Enzymol. biol. clin. 1962-1963, 2, 45
- 94 - SCHAPIRA F., DREYFUS J.C., SCHAPIRA G.
Enzym. biol. clin. 1966, 7, 98
- 95 - SCHMIDT E. et SCHMIDT F.H. - KLIN. Wschr
1960, 38, 957
- 96 - S.J. SEGAL, O.W. DAVIDSON, K. WADA
Rôle of R.N.A. in the regulatory action of estrogen.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1965, 54, (782-787).
- 97 - SHAW C.R, BARTO E.
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.) 1963, 50, 211
- 98 - SHINOWARA et al.
J. Biol. Chem. 1942, 142, 921
- 99 - SIMON K.H.
Dië Laktat. Dehydrogenase und ihre Isoenzyme
Med. Mschr. 1968, 22, 9, 424-425
- 100 - SMITH O.W., KALTRIEDER N.B.
Endocrinology 1963, 73, 619
- 101 - SMITHIES O.
Biochem. J. 1955, 61, 629
- 102 - SOMOGYL M.
J. Biol. Chem.
1937, 119, 741
1938, 125, 399-414
J. Clin. Chem. 1960, 6, 23-25

103 - R.J. STEIN et V.M. STUERMER

Cytodynamic properties of the human endometrium 111
variations in the Nucleo protein content of the
Endometrium during the menstrual cycle

A.M.J. Ob. and Gyn., 1951, 61, (414-417).

V Metabolism and the enzymatic activity of the human
endometrium during the menstrual cycle.

1 Bid. 1952, 63, (359-370).

104 - STUERMER U.M. et STEIN R.J.

Am. J. Obstet. Gynec. 1951, 61, 668

105 - G.P. TALVAR, S.J. SEGAL

Prevention of hormone action by local application
of actinomycin D.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1963, 50, (226-230).

106 - G.P. TALVAR; S.J. SEGAL, A. EVANS, O.W. DAVIDSON

The binding of estradiol in the uterus : a mecha-
nism for depression of R.N.A. synthesis.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1964, 52, (1059-1066)

107 - M.A. TELFER and F.L. HIRAN, Jr

Biochemical responses of the rabbit endometrium and
myometrium to estradiol and progesterone.

Acta Endocrinol. 1957, 59, (165-169)

108 - D. TUFT et J. GORSKI

A receptor protein for estrogens : its isolation from
the rat uterus and preliminary characterization.

J. Cell Biol., 1965, 27, 107 A.

109 - H. UI and G.C. MUELLER

The rôle of R.N.A. synthesis in early estrogen ac^tion.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1963, 50, (256-260)

110 - UNBEHAUN et al.

Lactate dehydrogenase isoenzyme in the ovary

Med. Welt. 1967 51, 3116-3117

111 - VESELL E.S., BEARN A.G.

Proc. Soc. Exp. Biol. med. 1957, 94, 96

- 112 - VESELL E.S.
J. Exp. med. Surg. 1965, 23, 10
- 113 - VESELL E.S.
In progress in human genetics,
A.G. Steinberg and A.G. BLARN Eds
GRUNE and STRATTON NEW-YORK 1966
- 114 - VINCENT D., SEGONZAC G.
Ann. Biol. Clin. 1951, IX, 359-363
Ann. Biol. Clin., 1961, XIX, 651-653
- 115 - WAGNER D., RICHART R.M., TERNER J.Y.
DNA content of human endometrial gland cells during
the menstrual cycle
Am. J. Obst. and Gyn. 1968, 100/1, 96
- 116 - WALAAS O., WALAAS E. and LOKEN F.
Effect of estradiol monobenzoate on the metabolism
of the rat endometrium
Acta Endocrinol. 1952, 11, (61-65)
- 117 - WEBB E.C.
Enzymol. Biol. Clin. 1965, 5, 124
- 118 - WEGMANN R., BANKOWSKI Z.
Differentiation histochimique de 4 groupes d'adé-
nosine triphosphatases selon Slater.
Ann. Histochem., 1960, 5, (121-141).
- 119 - WEILAND T., PFLEIDERER G., HAUPT I., WARNER W.
Biochem. 1959, 2, 331, 103
- 120 - WIDY - KIERSKA K. et al.
Lactate dehydrogenase isoenzymes in patients with
uterine tumors
Obstet. Gynecol. 1969, 33, 173-176

- 121 - WIEME R.J.
Studies on agar-gel electrophoresis
1959, 1 vol. editoris ARSCIA BRUXELLES
- 122 - WIEME R.J., DEMEULENAERE L.
Acta gastroenterologica belg. 1959, 22, 69
- 123 - WIEME R.J., DEMEULENAERE L.
Bibliotheca gastroenterologica 1961, 4, 64
- 124 - WIEME R.J., VAN MAERCKE Y.
Am. N.Y. Acad. Sci. 1961, 94, 898
- 125 - WIEME R.J., HERPOL J.E.
Nature 1962, 194, 287
- 126 - WIEME R.J., LAURIJSSSENS M.
Lancet 1962, i, 433
- 127 - WIEME R.J.
~~Post~~graduate medicine 1964, 35, A 38
- 128 - WIEME R.J.
Agargel electrophoresis
Elsevier publish Cy, AMSTERDAM 1965, 1 vol.
- 129 - G.B. WISLOCKI, E.W. DEMPSEY
Histochemical reactions in the endometrium in
prograncy.
Amer. J. Anat., 1945, 77, (365-403).
- 130 - WILSON A.C., CAHN D.D., KAPLAN N.O.
Nature 1963, 197, 331
- 131 - WILSON E.
Nature 1967, 215, 758
- 132 - WILSON E.
Endocrinol 1969, 44, 63
- 133 - YOSHINAGA K., HAWKINS R.A., STOCKER J.F.
Endocrinology 1969, 35, 103

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
I - INTRODUCTION	
II - De la BIOPSIE D'ENDOMETRE Notre méthode de travail	4
III - De la méthode HISTOLOGIQUE et HISTO- CHIMIQUE	6
Classification de notre matériel d'étude	7
IV - De la méthode BIOCHIMIQUE	14
Préparation du prélèvement Techniques de laboratoire	15
V - Première partie :	
LA PHOSPHATASE ALCALINE	
Généralités	26
Les résultats HISTOCHIMIQUES	27
Le dosage de l'activité phosphatique	28
VI - Deuxième partie :	
LA LACTASE DESHYDROGENASE : SES ISO- ENZYMES	
LA LACTATE DESHYDROGENASE GLOBALE ..	39
LES ISOENZYMES de la L D H	42
Définition	43
Structure des isoenzymes Significations physico-chimique physiologique	43
Isoenzymogrammes	47
Schéma directeur	51
Nos résultats	56
Réalisation des graphes et des calculs	57
VII - CONCLUSIONS	
VIII - BIBLIOGRAPHIE	

S E R M E N T D ' H I P P O C R A T E

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes Confrères si j'y manque.
