

OPTIMISATION DES PARAMETRES DE DOSAGE DE LA LDH TOTALE (LACTATE – DESHYDROGENASE) PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS LA VIANDE OVINE

Reçu le 20-06-2009 – Accepté le 15-06-2010

Résumé

Les différents paramètres de dosage spectrophotométriques de l'activité de l'enzyme lactate-déshydrogénase (LDH) dans la viande ovine ont été optimisés, et ce dans le but d'étudier par la suite l'influence de l'application de facteurs technologiques tels que la chaleur ou le froid sur son activité et permettre d'en déduire si cette viande a subi ou pas un de ces traitements. Le muscle retenu pour notre étude est le diaphragme, car ce muscle peut être prélevé sans déprécier la carcasse. L'influence de la concentration de substrat (Km), du pH, du tampon, de la température de pré-incubation, de la durée d'incubation sur les activités enzymatiques dans le muscle a été étudiée. Nous avons également étudié la répétabilité ainsi que la reproductibilité de la méthode de dosage.

Mots clés : viande ovine, LDH, optimisation, dosage spectrophotométrie.

Abstract

The various parameters of spectrophotometric assay of the lactate dehydrogenase enzyme's activity in ovine meat have been optimized, in order to study subsequently the influence of the application of technological factors such as heat or cold on its activity and allow deducing whether the meat has undergone or not one of these treatments. The chosen muscle for our study is the diaphragm; this one may be taken without devaluating the carcass. The influence of substrate concentration (Km), pH, buffer, temperature of preincubation and the incubation period on the enzymatic activities in the muscle has been studied. We have also studied the repeatability and reproducibility of the assay.

Keywords: Ovine meat, LDH, optimization, spectrophotometric assay.

T. M. HAMDI

Laboratoire d'hygiène alimentaire. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger BP 161 El-Harrach, Alger. Algérie.

ملخص

Lactate déshydrogénase

: 37 :

pH :7,5 :

$2,5 \times 10^{-3}$:

20

Lactate déshydrogénase

: _____

Les viandes, composées en majeure partie de matières organiques sont sujettes à de nombreuses transformations biochimiques et physico-chimiques au cours de leur stockage. Lors de congélation-décongélation, il y a redistribution cellulaire des enzymes lysosomiales et mitochondriales dans le tissu musculaire.

Ces modifications peuvent nous renseigner sur l'ampleur des dégâts occasionnés par le froid aux cellules musculaires au cours du stockage, mais également peuvent être utilisées comme base de méthodes pour la différenciation entre les viandes fraîches et les viandes congelées-décongelées. Les viandes ne présenteront plus les mêmes caractères organoleptiques que les viandes fraîches et leur valeur marchande se voit diminuée. Il est donc important de pouvoir détecter *a posteriori* si une viande a subi ou non une congélation.

Différents auteurs ont développé des méthodes basées sur l'étude des activités enzymatiques dans les viandes (Hamm et Kormendy, 1969 ; Gottesmann et Hamm, 1983; Gottesmann et Hamm, 1985; Sen et Sharma, 2001) et dans la chair de poissons (Rehbein H., 1979; Kitamikado et al, 1990 ; Garcia de Fernando et al, 1992; Duflos et al, 2002; Hoz et al, 2007). Notre travail consiste à optimiser dans des homogénats musculaires, les différents paramètres de dosage de la LDH (lactate-déshydrogénase), enzyme caractérisant le métabolisme glycolytique anaérobie, dans le but de mettre au point une méthode fiable pour détecter ces pratiques frauduleuses. Cette méthode se base sur la mesure des variations d'activité de cette enzyme par dosage spectrophotométrique, lors de l'exposition de la viande à différents traitements technologiques (réfrigération et congélation).

Ce travail constitue une première étape pour l'étude de l'influence du froid sur l'activité de la LDH dans la viande ovine.

MATERIEL ET METHODE

Echantillonnage

Afin de limiter au maximum, les facteurs de variations d'activité enzymatiques de la LDH totale, nous avons choisi de travailler sur un seul et même muscle le diaphragme. Ce choix est justifié également par le fait que ce muscle peut être prélevé sans déprécier la carcasse.

Tous les échantillons sont prélevés au niveau des abattoirs d'Alger, sur des carcasses en état de pré-rigor. Après identification (date, âge et sexe de la carcasse), ils sont parés puis débarrassés de leurs aponévroses et des graisses.

Appareils :

- Spectrophotomètre avec cuve thermostatée (Dr Lange modèle LP6 A)
- Ultra-turrax
- Centrifugeuse réfrigérée (Beckman, modèle J21 B)

- Cuves à usage unique
- Balance (Mettler H10)

Réactifs :

- Solution de sodium pyruvate : 22,7 mmoles/l dans 0.1 M/L de tampon phosphate pH 7,5 (Sigma)
- Tampon phosphate 0,1 M/L, pH 7,5 à 25°C (Sigma)
- Tampon Tris-HCL 0,05M, pH 7,6 (Sigma)
- NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite. 0,2 mg/flacon (0,256 mmoles) (Sigma)
- Eau physiologique à 9 ‰ (0.15M)

Méthodes

Préparation de l'échantillon

Dans un tube à centrifugation en verre (30ml) sont mélangés 1 gr de viande et 9 ml d'eau physiologique. Le broyage de la viande s'effectue durant 40 secondes directement dans le tube placé dans un cristalliseur rempli de glace pilée, afin de limiter au maximum la dénaturation des protéines. Le broyat subit une centrifugation de 15 minutes à 4000 RPM, à +4°C. Le surnageant est récupéré pour être utilisé pour les dosages.

Dosage de la LDH totale

- Méthode : 2850 µl de tampon phosphate, puis 50 µl de surnageant sont ajoutés dans le flacon contenant 0.2 mg de NADH. Après agitation pour dissoudre le NADH, le mélange est porté à 37°C durant 20mn dans le bain-marie. Après cette étape de pré-incubation, 100 µl de sodium pyruvate sont ajoutés dans le mélange, homogénéisé puis transvasé dans une cuve jetable de 1 cm de coté. La lecture s'effectue dans la cuve thermostatée à +37°C à 334 nm et à 30 secondes d'intervalle pendant 4 minutes contre l'air. La période de lecture est celle où la variation de densité optique est linéaire (entre la 2^{ème} et la 4^{ème} minute).
- Mode d'expression de l'activité enzymatique : l'activité enzymatique de la LDH totale est déduite de des cinétiques des réactions enzymatiques selon la formule suivante :

$$[a] = \frac{DO / \text{min} * VT * 103 * FCT}{\epsilon (mMol.) * V * L}$$

ϵ (NADH2): coefficient d'extinction molaire ou absorbance à une longueur d'onde donnée d'une solution dans laquelle est dissoute une mole par litre

FCT: facteur de correction de température pour ramener la valeur à +25°C

VT: volume total dans la cuve

V: volume de l'échantillon

L: longueur du trajet optique en centimètres

DO/mn: variation de densité optique par minute

VT (3ml), L (1cm), FCT (0.51), ϵ (6 à 334 nm), et VE (0.05ml) étant constants, l'équation peut s'écrire de la manière suivante :

UI= DO/mn x F (facteur de multiplication) où F= 5100.

L'expression des résultats sera en UI= DO/mn x 5100. Dans cette étude, les unités utilisées sont des UI rapportées au litre de liquide biologique, dans ce cas au litre de surnageant à la dilution 10⁻³.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effets du pH et de la nature du tampon :

Deux solutions à différents pH, sont préparées et testées : le tampon phosphate 0.1M et le tampon Tris 0.05M. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau n°1 et schématisés par la figure n°1.

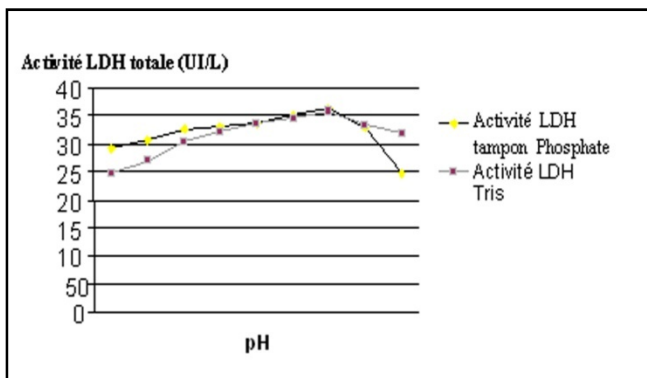


Figure 1: Effet du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la LDH totale

Tableau n°1 : Activités de la LDH totale en fonction du pH et de la nature du tampon

pH	6	6,2	6,5	6,8
	Activité de la LDH En UI/L			
Tampon phosphate	291,1	306,6	326,6	330,2
Tampon Tris	246,7	269,2	303,2	322,3

pH	7	7,2	7,5	7,8	8
	Activité de la LDH En UI/L				
Tampon phosphate	335,5	350	363	328,1	248,7
Tampon Tris	336,5	345	358,1	334,5	320

La nature du tampon semble n'avoir qu'une légère influence sur l'activité catalytique de l'enzyme, en particulier dans la gamme de pH allant de 6,8 à 7,8. Néanmoins, le tampon phosphate donne de meilleurs résultats que le tampon Tris, et la mesure de l'activité de la LDH à différents pH a permis de définir dans les deux cas, une valeur optimale de 7,5 (fig. n°1). Aux valeurs de pH inférieures à 6 ou supérieures à 8, les activités de l'enzyme sont fortement diminuées.

Effet de la température de pré-incubation

L'activité enzymatique de la LDH totale a été mesurée après 20 minutes de pré-incubation dans un intervalle de température allant de + 25°C à +60°C. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°2 et représentés par la figure n°2.

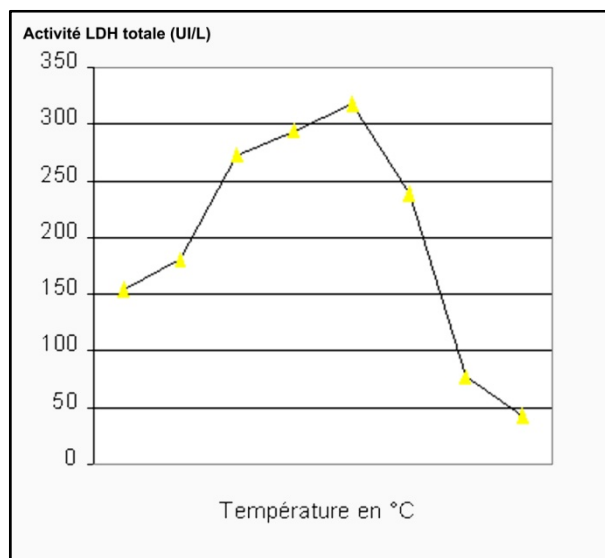


Figure 2: Effet de la température sur l'activité de la LDH totale musculaire chez les ovins

Tableau 2 : Influence de la température d'incubation sur l'activité de la LDH totale

T (°C)	25	30	35	40	45	50	55	60
LDH totale	153,9	179,6	272,4	295,1	318,8	237,8	77,97	42,1

L'expérimentation nous a permis de définir une activité optimale à +45°C (fig. n°). Cependant pour la suite de notre travail nous respecterons les recommandations de l'« enzyme commission » (Mathieu, 1982) qui préconise l'utilisation des températures suivantes : +25°C, +30°C et +37°C. +37°C est la température retenue pour la suite de notre étude, car elle permet une activation relativement importante de la réaction, supérieure à celles obtenues aux températures de +25°C et à +30°C. Il est intéressant de noter qu'à partir de +55°C, il subsiste uniquement une activité résiduelle, ces résultats concordent avec les observations de Tollersud (1970), qui constate une diminution de 65% de l'activité de la LDH sérique bovine après 30 minutes de pré-incubation à 60°C et de 100% à +65°C.

Influence de la durée de pré-incubation

L'influence de la durée de pré-incubation du mélange réactionnel sur l'activité de la LDH totale a été testé par pallier de 5 minutes, à partir de 5 jusqu'à 35 minutes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°3 et représentés par la figure n°3.

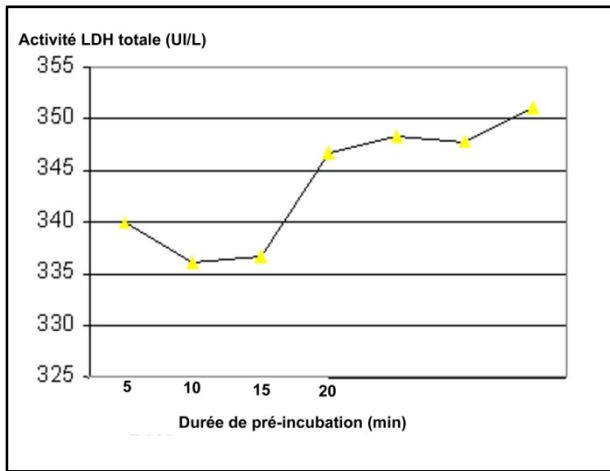


Figure 3: Temps de pré-incubation et activité de la LDH totale à 37°C

Tableau n°3 : Influence de la durée d'incubation sur l'activité de la LDH totale

DI (mn)	5	10	15	20	25	30	35
LDH Totale UI/l	339,9	336	336,6	346,8	348,4	347,9	351,2

DI : Durée d'incubation

Il apparaît nettement que la durée d'incubation n'a pas beaucoup d'influence sur l'activité de la LDH totale (fig. n°3).

Calcul de la Km

La constante de Michaelis et Menten correspond à une concentration de substrat (S) pour laquelle la vitesse initiale (V) de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale (Vm).

Si S= 0 la vitesse initiale de la réaction est égale à 0

Si S= Km la vitesse initiale de la réaction est égale à Vm/2

Si S est largement supérieure à la Km, la vitesse initiale de la réaction est égale à Vm.

En règle générale, il est établi que les mesures des activités enzymatiques doivent se faire pour une valeur de V comprise entre 65 et 95% de la Vm.

Au cours de notre étude, le calcul de la Km est effectué après avoir fixé l'ensemble des paramètres suivants:

- Température : 37°C
- pH : 7,5
- Tampon phosphate : 0,1M
- Durée de pré-incubation : 20mn

La Km a été calculée pour une dilution de l'échantillon de 10⁻³. Une série de dilutions successives du substrat tamponné est réalisée à partir d'une solution mère à 22.7 mmol/l, puis testée avec l'échantillon. Les mesures effectuées ont permis d'établir une courbe expérimentale d'après l'équation établie par Michaelis et Menten :

$$v = f(S) = Vm \frac{[S]}{Km + [S]}$$

V, étant la vitesse initiale
 Vm, la vitesse maximale
 S, la concentration en substrat
 Km, la constante de Michaelis et Menten

La représentation linéaire de Lineweaver et Burk (Tze-Fei Wong, 1975) de l'équation de Michaelis et Menten, nous a permis d'établir l'équation de la droite de régression pour la dilution testée, et d'en déduire une valeur de la Km (tab n°4 et fig. n°4).

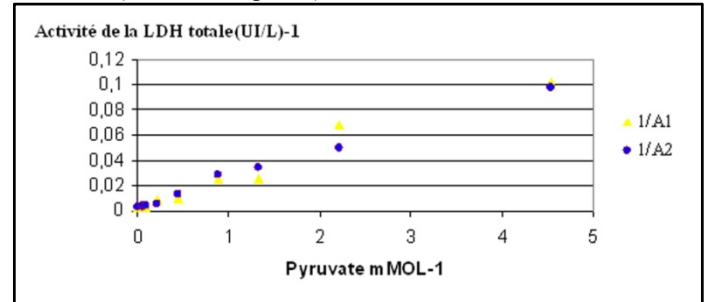


Figure 4 : Représentation de LINEWEAVER et BURK pour le calcul de la Km de la LDH totale musculaire chez les ovins

Tableau4 : Paramètres de calcul de la Km

Dilution de l'échantillon	Equation de la droite	Km
10 ⁻³	Y= 0.0148 X + 0.0059	2.5 10 ⁻³

L'équation de Michaelis et Menten exprimant la vitesse de la réaction en fonction de la concentration de substrat permet d'affirmer que la réaction enzymatique évolue à 90% de sa vitesse maximale pour une concentration de sodium pyruvate égale à 22,7 mmol/l (soit environ 8 fois la Km).

Fiabilité de la méthode : Nous avons testé la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

Répétabilité : Pour apprécier la répétabilité de la méthode de dosage, une série de mesures est réalisée sur 15 tubes réactions à partir du même extrait de viande et ce dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°5.

Tableau 5 : Répétabilité de la méthode de dosage de la LDH totale

Nombre de mesures	Activité de la LDH totale UI/L			Incertitude de mesurage m + ST/n (0.05)
	Moyenne (m)	Ecart-type	Cv%	
15	279,14	6,18	0,0221	279,14+ 3,42

Reproductibilité

Afin de pouvoir apprécier la reproductibilité de la méthode, 2 séries de 10 mesures chacune sont réalisées à partir de 2 prélèvements différents (extraits de viande) effectués sur un même muscle. Les résultats sont exprimés dans le tableau n°6

Tableau n°6 : Reproductibilité de la méthode de dosage de la LDH totale

Numéro de la série	Nombre de mesures	Activité de la LDH totale			
		UI/L	S	CV%	m± ST/n (0,05)
1 ^{ère}	10	328,45	16,76	5,1	328,45± 11,98
2 ^{ème}	10	334,34	16,11	4,81	334,34 ± 11,52

Conclusion

L'optimisation de la méthode de dosage en spectrophotométrie de la LDH totale dans la viande ovine, nous a permis non seulement d'établir une valeur approchée de la Km de cette enzyme pour le pyruvate, valeur que nous n'avons pas retrouvé dans la bibliographie, mais aussi de noter que l'activité catalytique de la LDH est fortement diminuée après 20 minutes, aux températures supérieures à +55°C. Ceci permet d'envisager une éventuelle méthode de contrôle de l'assainissement des produits carnés par la chaleur.

Les paramètres de dosage de la LDH ainsi optimisés nous permettront d'étudier l'influence de la réfrigération, de la congélation et décongélation sur l'activité de cette enzyme dans la viande ovine.

REFERENCES

- [1]- Duflos G., Le Fur B., Mulak V., Becel P., Malle P., 2002, Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets, *Journal of Science Food and Agriculture*, 82, pp. 1341-1345.
- [2]- Garcia de Fernando G.D., Fernandez M., Diaz O., Ordonez J.A., Hoz L., 1992, An objective method to differentiate between fresh and thawed Trout meat, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 43, pp. 13-14
- [3]- Gottesmann P., Hamm R., 1983, New biochemical method of differentiating between fresh meat and thawed, frozen meat. *Fleischwirtschaft*, 63, (2), pp. 219-221.
- [4]- Gottesmann P., Hamm R., 1985, New biochemical method of differentiating between fresh liver and thawed, frozen liver. *Fleischwirtschaft*, 60, (5), pp. 591-592.
- [5]- Hamm R., Kormendy L., 1969, Transaminases of skeletal muscle. 3. Influence of freezing and thawing on the subcellular distribution of glutamic-oxaloacetic

transaminase in bovine and porcine muscle, *Journal of Food Science*, 34, pp. 452-456.

- [6]- Hoz L., Yustes C., Cámara J.M., Ramos M.A., García De Fernando G.D., 2007, β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) differentiates unfrozen from frozen-thawed crawfish (*Procambarus clarkii*) and trout (*Salmo gairdneri*) meat, *International Journal of Food Science and Technology*, 27, (2), pp. 133 – 136.
- [7]- Kitamikado M., Yuan C.S., Ueno R., 1990, An enzymatic method designed to differentiate between fresh and frozen thawed fish, *Journal of Food Science*, 55, (1), pp. 74-76
- [8]- Mathieu A., 1982, Recommandations. (Société Française de Biologie Clinique : Commission Enzymologie). *Annales de Biologie Clinique*, 40, pp. 87-116.
- [9]- Sen A R., Sharma N., 2001, Differentiation between fresh and frozen-thawed pork, *Journal of food science and technology*, vol. 38, n°5, pp. 537-539.
- [10]- Tollersud S., 1970, Heat stability of serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme in young and adult cattle and sheep, *Acta Veterinaria Scandinavia*, 11, pp. 510-524.
- [11]- Tze-Fei Wong, 1975, Kinetics of enzyme mechanisms, *Ed. Academic Press*, London, pp. 540.
- [12]- Rehbein H., 1979, Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. I. Comparison of the applicability of some enzymes of fish muscle. *Z Lebensm Unters Forsch*; 169, 4, pp. 263-265.