

(Institut de Clinique et de Policlinique Médicales. Université de Liège  
[Professeur L. Brull].)

**Cristallin en survie selon la méthode de  
De Haan-Bakker.  
Composition du liquide de perfusion.**

Par ROGER WEEKERS,  
Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

D'une façon générale, isoler un organe et en observer le fonctionnement, établir ensuite les modalités qui distinguent ce métabolisme simplifié du métabolisme plus complexe *in vivo*, constitue une méthode instructive pour l'étude de l'interréaction des organes.

De telles recherches peuvent être utilement appliquées au cristallin. Parmi les nombreuses indications qu'il est possible d'entrevoir, les unes intéressent directement le physiologiste ; d'autres dérivent de problèmes posés par la clinique. Parmi les premières, nous ne citerons à titre d'exemple que l'étude du métabolisme hydrocarboné et ses relations avec les sécrétions endocrines ; parmi les secondes, le mécanisme des troubles transitoires de la réfraction ou encore l'étiologie des cataractes diathésiques.

L'étude expérimentale de l'un ou l'autre de ces problèmes est possible grâce à l'emploi d'une méthode assurant la survie du cristallin. Cet organe se prête d'ailleurs particulièrement bien aux expériences d'isolement. L'absence de circulation sanguine et d'innervation en rend la dissection aisée. De plus, les deux cristallins d'une paire d'yeux normaux offrent une similitude presque parfaite tant au point de vue de leur composition chimique que de leur métabolisme. Placés dans des conditions expérimentales semblables leur comportement est identique ; soumis à des influences diverses, l'un sert de contrôle à l'autre.

Pour assurer au cristallin, en dehors de l'animal, un métabolisme normal pendant un temps prolongé, certaines conditions doivent être strictement réalisées.

Immergé dans quelques cc. de solution de *Ringer* à 37° C. le cristallin s'opacifie en un temps assez court et meurt intoxiqué par les déchets de son propre métabolisme.

Le renouvellement ou mieux la circulation du liquide pare

à cet inconvénient, mais souligne l'insuffisance de la solution de *Ringer* comme milieu nutritif.

L'humeur aqueuse constituerait un milieu idéal, mais est malheureusement impossible à obtenir en quantité suffisante. Semblable objection peut être formulée contre l'emploi du liquide céphalo-rachidien ou d'un ultra-filtrat sanguin. Quoique la composition de l'humeur aqueuse soit actuellement relativement bien connue, il serait difficile de composer de toutes pièces un liquide synthétique sans s'exposer à des omissions peut-être importantes.

A ce problème, *Bakker* a apporté une solution satisfaisante ; cet auteur, en appliquant au cristallin la méthode créée par *De Haan* pour la culture des leucocytes, a obtenu, dans de bonnes conditions, une survie prolongée de cet organe.

L'appareil de perfusion est à peu près identique à celui décrit par *De Haan* lui-même (1). Le liquide nourricier est obtenu en injectant un volume assez important de solution de *Ringer* dans la cavité abdominale du lapin et en le ponctionnant quelques heures après l'injection. Par son passage sur l'animal, le *Ringer* s'enrichit de constituants multiples et sa composition se rapproche de celle du sérum. Après sédimentation des éléments figurés, qui inévitablement ont transsudés, ce liquide constitue pour le cristallin un bon milieu de culture ; la transparence de la lentille qui s'y trouve immergée reste parfaite pendant des semaines ; des mitoses normales peuvent être décelées après plusieurs jours ; la réparation d'une blessure est histologiquement identique à celle de l'organe in situ ; le métabolisme ne subirait, d'après *Bakker*, aucune modification ni qualitative, ni quantitative (2, 3, 4).

Telle quelle la méthode de *De Haan-Bakker* constitue un progrès important sur toutes les expériences de ce genre réalisées auparavant.

Cependant, certains desiderata ne sont pas réalisés. Ce milieu de culture ne satisfera pas les partisans de la théorie sécrétrice de l'humeur aqueuse. Le liquide de ponction ne possède, en plus des constituants du *Ringer*, que des substances diffusées du sang ; pour ne citer qu'un exemple, il ne contient vraisemblablement pas les hexosamines dont la présence dans l'humeur aqueuse a été récemment démontrée et qui n'existent pas dans le sang (5). *Bakker* lui-même mentionne que le cristallin en survie perd rapidement sa vitamine C (6).

Malgré ces objections dont l'importance ne pourra être

établie que par des recherches ultérieures, la méthode de *De Haan-Bakker* dans sa forme actuelle, permet de maintenir le cristallin en survie pendant un temps prolongé. Il paraît possible d'utiliser cette technique à de multiples fins.

#### *Résultats expérimentaux.*

Le présent travail n'est qu'une note préliminaire aux expériences d'isolement du cristallin. Les résultats y mentionnés ne concernent que la composition du milieu nutritif obtenu selon la technique de *De Haan-Bakker*.

A priori, il est vraisemblable qu'une solution injectée dans la cavité abdominale s'équilibre en un temps plus ou moins long avec le sang et que sa composition se rapproche progressivement de celle des milieux physiologiques. *Ferringa* et *De Haan* (7, 8) ont étudié ce problème, mais les conditions expérimentales dans lesquelles ces auteurs se sont placés ne sont pas toujours identiques à celles mentionnées par *Bakker*. La composition et la quantité de liquide injecté varient notablement. Il ne nous a donc pas paru inutile de contrôler expérimentalement la composition du liquide de ponction obtenu en se conformant de façon stricte à la technique de *Bakker*.

Le liquide utilisé est une solution de *Ringer* légèrement modifiée et contient par litre : 7,5 gr. de NaCl ; 1 gr. de NaHCO<sub>3</sub> ; 0,2 gr. de KCl ; 0,2 gr. de CaCl<sub>2</sub>.

Chaque animal est injecté 4 fois à 24 heures d'intervalle ; la première injection n'est que préparante et n'est pas suivie de ponction. Le volume de la solution et la durée du séjour dans la cavité abdominale sont deux facteurs déterminant la composition du liquide. Afin de réduire au minimum possible les variations du milieu nutritif, ces deux facteurs sont constants dans nos expériences : 350 cc. sont utilisés par kg. d'animal et ponctionnés 2 heures 30 après l'injection. Dans ces conditions, un lapin de 2 kg. fournit 300 à 400 cc. de liquide par jour.

Si, à la suite d'une injection défectueuse, le volume du liquide de ponction est inférieur à 300 ccm., l'échantillon doit être écarté, car sa composition est aberrante.

Le liquide ainsi obtenu est opalescent. On peut le débarrasser des éléments figurés qu'il contient et le clarifier par centrifugation. Il est toutefois plus simple afin de diminuer les risques de contamination microbienne de le laisser séjourner 48 heures à 37° et de le décantier.

Sauf indication spéciale, les dosages mentionnés dans ce travail ont été effectués soit immédiatement après la décantation soit plus tard après un séjour plus ou moins prolongé en glacière. Ils ne portent que sur des liquides stériles. L'activité des enzymes de ce milieu n'a pas encore été étudiée.

Les données expérimentales concernant les constituants principaux du liquide de *De Haan-Bakker* sont groupés dans le tableau ci-joint. La dernière colonne, à titre de comparaison, concerne l'humeur aqueuse ; les données qui y sont réunies ont été fournies par la littérature des dernières années.

	Liquide de De Haan-Bakker					humeur aqueuse (d'après la littérature)
	Nombre de lapins	Nombre de dosages	mini- mum	maxi- mum	mo- yenne	
Solides totaux (gr./100 cc.)	5	8	1,02	1,28	1,14	1,05—1,15
pH		cf. Texte			7,3 <sup>1</sup>	7,1—7,4
Indice de réfraction	5	9	1,3345	1,3355	1,3350	1,3340—1,3358
			milligrammes par 100 cc.			
Azote total	6	8	19,6	38,5	27,7	20—30
Azote protéique	6	8	9,8	24,5	17,1	4—5
Azote non protéique	6	8	8,9	14,0	10,6	16—25
Urée	4	7	13	19	16	17—30
Ac. urique	3	5	traces	traces	traces	traces—4
Glucose	6	11	36	51	42	77—98
Sodium	6	8	260	315	300	280—330
Potassium	6	8	7,5	13,2	9,9	18—22
Calcium	3	4	5,2	5,9	5,5	6—8
Chlore	5	7	410	432	425	400—470
Phosphore minéral	6	10	1,70	2,80	2,23	3,00—3,50

<sup>1</sup> Recueilli sous paraffine, centrifugation et mesure immédiates.

La teneur en *solides totaux* du liquide péritonéal est du même ordre de grandeur que celle de l'humeur aqueuse.

Quoiqu'ayant déjà fait l'objet de nombreux contrôles, la détermination du *pH* et surtout les causes de ses variations doivent être poursuivies. Nos observations concordent avec celles de *Ferringa* et peuvent être schématisées de la façon suivante : En quelques minutes de séjour dans la cavité péritonéale, le liquide injecté prend un *pH* voisin ou légèrement plus acide que celui du sang. Ce fait se vérifie quel que soit le *pH*. initial et reste vrai aussi bien pour du *Ringer* (*pH* 7,4) que pour une solution plus riche en bicarbonate et plus alcaline (*pH* 8,5) telle

que l'emploie *Bakker*. Prélevé après 2 heures 30 de séjour dans la cavité péritonéale, recueilli sous paraffine et séparé de ses globules blancs par une centrifugation immédiate, le liquide conserve pendant un temps prolongé une réaction identique à celle de l'humeur aqueuse. Au contraire, mis au contact de l'air pendant quelques heures, le pH s'élève, atteint ou dépasse 8 ; le liquide s'alcalinise.

La présence des globules blancs lors de la décantation à 37° C. est cause d'une légère acidification.

Il en résulte que, pour placer le cristallin dans des conditions aussi proches que possible de celles réalisées dans l'humeur aqueuse, il serait préférable de recueillir le liquide sous paraffine et de centrifuger immédiatement les globules blancs.

Les *indices de réfraction* du liquide de ponction et de l'humeur aqueuse sont identiques.

Les chiffres *d'azote non protéique* sont un peu trop bas. Cette légère discordance s'atténuerait vraisemblablement si l'on prolongeait le temps du séjour du liquide injecté dans la cavité péritonéale.

Au contraire le liquide contient plus *d'azote protéique* que l'humeur aqueuse. L'introduction d'un volume aussi important de *Ringer* dans l'abdomen étant inévitablement la cause d'un certain degré d'irritation, la présence d'une fraction du gramme de protéine par litre n'a rien de surprenant.

Les chiffres des dosages *d'urée* concordent avec ceux obtenus pour l'humeur aqueuse.

La recherche de *l'acide urique* n'a jamais révélé la présence que d'une fraction de milligramme de cette substance dans 100 cc. de liquide.

Pour atteindre une concentration comparable à celle de l'humeur aqueuse, le liquide de ponction doit être enrichi en *glucose*. L'activité glycolytique de ce liquide semble faible ou nulle.

La teneur en *sodium* est optima.

La concentration du *potassium* n'est que peu modifiée par le passage sur l'animal et reste sensiblement inférieure à celle de l'humeur aqueuse.

La teneur en *calcium* correspond à la fraction diffusible du calcium sanguin et concorde de façon satisfaisante avec celle de l'humeur aqueuse.

La teneur en *chllore* est optima.

La concentration du *phosphore minéral* reste inférieure à la phosphatémie et n'atteint donc pas celle de l'humeur aqueuse<sup>1</sup>.

Quoique fragmentaires, ces données montrent que, lors du passage dans la cavité abdominale du lapin, le *Ringer* injecté s'enrichit d'un nombre considérable de constituants qui, normalement, existent dans l'humeur aqueuse. Sa composition devient plus complexe et se rapproche sensiblement de celle des milieux physiologiques. Certaines discordances et peut-être même certaines lacunes persistent néanmoins. Beaucoup d'entre elles pourraient vraisemblablement être atténuées ou supprimées, soit en injectant un moindre volume de solution, soit en prolongeant le temps de séjour dans l'animal. Ces nouvelles conditions expérimentales présenteraient toutefois des inconvénients qui doivent les faire rejeter : la réduction du volume du liquide de ponction, l'augmentation de la teneur en azote protéique. Pour être tout à fait complet le liquide péritonéal devrait être additionné des substances propres à l'humeur aqueuse et qui sont vraisemblablement le produit d'une sécrétion.

Ces différences de concentration de quelques constituants normaux, l'absence même de certains d'entre eux, ne semblent pas avoir d'action néfaste immédiate sur le métabolisme du cristallin, car les expériences de *Bakker* ont dès maintenant établi que pendant des jours, pendant des semaines, le cristallin isolé et irrigué par le liquide péritonéal ne montre aucune altération décelable.

### Résumé.

La méthode de perfusion de *De Haan-Bakker* assure la survie du cristallin en dehors de l'organisme pendant un temps prolongé.

Le milieu nutritif est obtenu en injectant une solution de

<sup>1</sup> Les techniques de dosage suivantes ont été utilisées :

*pH* : méthode photométrique,

*N total et non protéique* : méthode de *Kjeldahl*,

*urée* : méthode à l'urécase,

*ac. urique* : méthode photométrique selon *Heilmeyer* et *Krebs*,

*glucose* : méthode de *Hagedorn-Jensen*,

*Na, K, Ca* : spectrographie d'émission. Les dosages de ces trois éléments ont été effectués par le Docteur *A. Lambrechts*. Je tiens à lui exprimer ici mes sincères remerciements.

*Cl* : méthode de *St-Rusznayk*,

*P minéral* : méthode de *Bell-Doisy-Briggs*.

*Ringer* dans la cavité abdominale du lapin et en la ponctionnant 2 heures 30 après.

Par son passage sur l'animal, le *Ringer* s'enrichit de nombreux constituants et sa composition se rapproche de celle de l'humeur aqueuse.

L'étude de certaines propriétés physiques et des constituants chimiques principaux du liquide de ponction font l'objet du présent travail.

#### *Zusammenfassung.*

Die Durchströmungsmethode von *De Haan-Bakker* gewährleistet während längerer Zeit das Ueberleben der Linse außerhalb des Organismus.

Die Kulturflüssigkeit wird erhalten, indem *Ringer*-Lösung in die Unterleibshöhle des Kaninchens injiziert und nach 2½stündigem Verweilen durch Punktion entnommen wird.

Während der Tierpassage findet eine Anreicherung zahlreicher Bestandteile in der *Ringer*-Lösung statt, deren Zusammensetzung sich dabei derjenigen des Kammerwassers nähert.

In der vorliegenden Arbeit werden bestimmte physikalische Eigenschaften und die hauptsächlichsten chemischen Bestandteile der durch Punktion erhaltenen Flüssigkeit untersucht.

#### *Summary.*

The *De Haan-Bakker* method of perfusion assures the life of the lens outside the organism for a long time.

The medium of culture is obtained by injecting *Ringer* solution into the abdominal cavity of the rabbit and recovering the same by puncture about 2½ hours later.

During its stay in the animal, the *Ringer* solution is enriched with a number of constituents the composition of which approaches near to that of the aqueous humour.

The present paper brings the results of the study of certain physical properties as also the main chemical constituents of the solution regained by puncture.

#### *Bibliographie.*

1. *J. De Haan*, Acta Neerl. Morphologiae 1937, 1, 12. — 2. *A. Bakker*, Arch. f. Ophth. 1936, 135, 581. — 3. *A. Bakker*, Acta Neerl. Morphologiae 1937, 1, 97. — 4. *A. Bakker*, Arch. f. Ophth. 1936, 136, 333. — 5. *K. Myer*, *E. Smyth*, *E. Gallardo*, Am. Journ. Ophth. 1938, 21, 1083. — 6. *A. Bakker*, Arch. f. Ophth. 1936, 136, 166. — 7. *K. J. Ferringa* und *J. De Haan*, Pflügers Arch. Physiol. 1922, 197, 404. — 8. *K. J. Ferringa*, Pflügers Arch. Physiol. 1923, 199, 365; 1923, 200, 159; 1924, 203, 663; 1924, 203, 672.