

14

ARCHIVES D'OPHTALMOLOGIE

EXTRAIT

L'acide formique des tissus oculaires.

PAR

ARLINGTON G. KRAUSE et ROGER WEEKERS

(*Archives d'Ophthalmologie.* — n. s., t. 3, N° 3, Mars 1939.)

MASSON & C^{ie}, EDITEURS
120, BOULEVARD ST-GERMAIN, PARIS (VI^e)

L'acide formique des tissus oculaires.

Par

ARLINGTON C. KRAUSE et ROGER WEEKERS (1)

Les tissus oculaires présentent du point de vue de leur constitution et de leur métabolisme, certaines analogies avec les autres tissus de l'organisme. Si différenciés que soient les constituants de l'œil, les progrès acquis en biochimie peuvent souvent leur être appliqués.

Le métabolisme des hydrates de carbone semble être la source principale d'énergie d'un grand nombre d'organes. Son importance est, du fait même, capitale. Les multiples intermédiaires de la dégradation du glucose ont fait, au cours de ces dernières années, l'objet de recherches fructueuses. Encore que l'extrême labilité de certaines de ces substances en rende l'étude difficile, encore que l'existence même de certaines d'entre elles reste hypothétique, un schéma d'ensemble de ce métabolisme peut, dès maintenant, être ébauché. Il est toutefois prudent de considérer ce schéma plus comme une hypothèse de travail que comme une acquisition définitive. L'un de nous (1), utilisant les connaissances acquises dans l'étude de différents tissus et les données de recherches en ophtalmologie a, récemment, tracé semblable schéma pour le métabolisme hydrocarboné du cristallin. Les acides organiques qui y sont mentionnés, tels les acides lactique, pyruvique, fumarique, succinique, formique, citrique, malique font l'objet de recherches actuellement en cours.

La présente publication a trait plus spécialement à l'acide formique. Celui-ci (HCOOH), premier représentant de la série des acides organiques est la substance irritante de la piqûre des fourmis et de différents insectes. Sa diffusibilité, son instabilité, son grand pouvoir réducteur et la solubilité de ses sels en font un bon réactif biologique. Sa large distribution dans le règne animal fait croire à un rôle actuellement encore mal connu.

TECHNIQUE. — Deux cents yeux provenant d'un bétail âgé de 3 à 4 ans sont utilisés pour chaque série de déterminations. Étant donné la faible concentration de l'acide formique, 60 à 150 gr. de tissus sont nécessaires pour chaque dosage. Le délai entre le moment de la mort de l'animal et le début du dosage a été réduit au minimum possible. Un certain laps de temps étant cependant nécessaire à l'abatage

(1) Graduate Fellow of the Belgian American (C. R. B.) Educational Foundation Inc.

d'une centaine d'animaux et à la dissection des tissus correspondants, les globes oculaires sont conservés en glacière (+ 3° C. à + 5° C.) aussi bien aux abattoirs qu'au laboratoire et maintenus ainsi à une température aussi basse que possible.

La méthode utilisée pour le dosage de l'acide formique est la combinaison de deux techniques (2, 3). Elle comporte trois temps :

1° Déprotéinisation des tissus.

2° Distillation de l'acide formique et formation d'un formate de baryum.

3° Réduction par ce formate de chlorure mercurique en chlorure mercureux insoluble; titration de ce dernier.

Cette méthode appliquée à une solution de taux connu d'acide formique permet de retrouver 96 p. 100 de la quantité calculée (moyenne de 6 dosages; quantités d'acide formique utilisées : 0,5 mgr. à 3 mgr.)

1° DÉPROTÉINISATION. — Les protéines et plus particulièrement l'acide nucléique, pouvant, au cours de la détermination, donner naissance à une certaine quantité d'acide formique, tous les dosages ont été effectués sur un filtrat déprotéinisé.

Immédiatement après la dissection les tissus sont additionnés d'acide sulfurique 2/3 N et d'une solution de tungstate de sodium 10 p. 100 (0,5 à 1 cmc. de chacune de ces solutions par gramme de tissus selon la quantité de protéines solubles). L'extraction est prolongée pendant douze heures. On mesure alors le volume et l'on filtre. Le filtrat doit être acide et ne plus contenir de protéines.

2° DISTILLATION (2). — L'appareil à distillation comporte une source de vapeur d'eau, deux ballons de Kjendahl chauffés par deux micro-Bunsen et un condenseur. Pour prévenir la projection de particules liquides, le premier ballon est surmonté d'un bulbe à chicane. La tubulure arrivant au deuxième ballon est dilatée à son extrémité inférieure et perforée d'une douzaine de petits orifices; ce dispositif assure un meilleur contact de la vapeur et du liquide.

Un aliquot du filtrat (80 à 150 cmc.) additionné de 1 gr. d'acide tartarique est introduit dans le premier ballon; 2 gr. de carbonate de baryum en suspension dans 100 cmc. d'eau dans le deuxième. Ces volumes seront maintenus aussi constants que possible pendant la distillation. Celle-ci est prolongée pendant 4 à 6 heures et est arrêtée lorsque le volume du distillat atteint un litre. A ce moment, la totalité de l'acide formique distillé est fixé dans le deuxième ballon à l'état de formate de baryum. L'excès de carbonate de baryum est filtré. Le volume du filtrat est réduit par évaporation à 25-30 cmc.

3° RÉDUCTION ET TITRATION (3). — Le filtrat est transféré dans un matras d'Erlenmeyer de 150 cmc. et additionné de 10 cmc. de la solution de chlorure mercurique (200 gr. $HgCl_2$; 300 gr. acétate de Na; 80 gr. NaCl ad 1.000 cmc.) puis immergé pendant deux à trois heures dans un bain-marie bouillant. Un petit entonnoir posé sur le col du matras prévient une évaporation exagérée. Le chlorure mercureux formé par réduction et pratiquement insoluble dans l'eau se précipite sous forme de fines granulations blanches. La réduction terminée la solution est refroidie et additionnée de 10 cmc. de HCl 10 p. 100 (30 cmc. d'acide fort dans 70 cmc. d'eau) et de 4,5 gr. de KI dissous dans un minimum d'eau. Un précipité rouge se forme et se redissout presque instantanément; la solution prend une teinte jaune claire; une partie du calomel entre en solution. On ajoute alors lentement un volume d'une solution d'iode N/10 suffisant pour dissoudre le calomel restant. Ce volume est mesuré très exactement (15 à 20 cmc. suffisent en général). Une partie de l'iode est réduit, l'excès restant est titré en retour, en présence d'amidon, par une solution de thiosulfate N/10. Un large excès d'iode étant nécessaire pour mettre le calomel en solution, la titration doit être effectuée avec la précision la plus rigoureuse.

Calcul : n. cmc. d'iode N/10 utilisés $\times 2,3 = n$. milligr. d'acide formique dans l'aliquot prélevé.

Les dosages en double sur un même filtrat tungstique sont toujours parfaitement concordants. Deux dosages en blanc sont effectués avec chaque groupe de distillations. Le tableau ci-après réunit les résultats obtenus dans ces conditions expérimentales.

La méthode de dosage, telle qu'elle a été décrite n'est pas à l'abri de tout reproche :

1° Il est possible que malgré les précautions prises, des changements *post-mortem* altèrent la quantité d'acide formique normalement contenue dans les tissus. Seul l'emploi d'yeux gelés *in vivo* paraît à cette critique. De tels tissus ne peuvent être

obtenus qu'en faible quantité. L'absence de micro-méthode pour le dosage de l'acide formique plus sensible que celle décrite fait que cette technique de choix est actuellement inapplicable aux tissus oculaires.

2° La méthode est basée sur le pouvoir réducteur d'un distillat et, du fait même, n'est pas rigoureusement spécifique. Les résultats obtenus sont peut-être d'un certain pourcentage trop élevé. L'isolement quantitatif de quelques milligrammes d'acide formique contenus dans plusieurs centaines de grammes de tissus étant actuellement impossible, il n'existe pas de technique à l'abri de cette objection.

Acide formique: mgr./100 gr. de tissus frais.

TISSUS	NOMBRE DE DÉTERMINATIONS	MINIMUM	MAXIMUM	MOYENNE
Cornée	4	0,84	1,63	1,15
Iris	5	1,96	3,50	2,55
Cristallin	5	1,02	1,20	1,16
Corps vitré	4	0,78	1,65	1,15
Rétine	6	0,78	1,35	1,10
Choroïde	4	1,61	2,05	1,86
Sclérotique	5	0,95	1,33	1,19
Nerf optique	5	1,29	1,95	1,52

L'acide formique du corps ciliaire n'a pas été déterminé.

L'épithélium pigmentaire de la rétine reste adhérent à la choroïde.

DISCUSSION

L'acide formique est présent dans la plupart des liquides et des tissus de l'organisme. Son origine et surtout son rôle sont incertains (4).

Sa concentration dans l'urine varie avec la nature de l'alimentation (5, 6) et atteint des valeurs particulièrement élevées lors de l'intoxication par l'alcool méthylique (7).

Sa présence dans le sang, mise en doute par certains auteurs (8), est cependant admise par d'autres (9, 10). Il semblerait que la concentration en soit abaissée chez les diabétiques et après enlèvement du pancréas, élevée par injection d'insuline (10, 11). La confirmation de ces résultats apporterait un argument en faveur du rôle joué par l'acide formique dans le métabolisme hydrocarboné.

Quelle est l'origine, quel est le rôle de l'acide formique dans le métabolisme tissulaire ? De recherches effectuées *in vitro*, il résulte que l'oxydation des hydrates de carbone ou des protéines peut mener à la formation d'acide formique. Si intéressantes que soient ces données, leur application en biologie n'est pas immédiate. Étant donné l'extrême complexité des milieux physiologiques et la multiplicité des enzymes tissulaires, la comparaison des phénomènes *in vitro* et *in vivo* est souvent illusoire.

Des données récemment acquises au sujet du métabolisme du glucose, il semble que l'acide formique soit un produit d'oxydation de l'acide lac-

tique. C'est à ce titre que l'acide formique joue peut-être un rôle dans le métabolisme du cristallin.

Le glucose de l'humeur aqueuse passe au travers de la capsule et pénètre dans le cristallin; il y subit les phénomènes complexes de la glycolyse (1, 12) aboutissant à la formation d'acide lactique (13, 14). C'est là vraisemblablement, la principale source d'énergie du cristallin; l'intégrité de ce processus est une condition essentielle de la vie de cet organe; une altération grave et persistante mène à coup sûr à l'opacification de la lentille.

Une fraction importante de l'acide lactique formé diffuse vers l'humeur aqueuse (15, 16); une autre fraction vraisemblablement moindre subit une nouvelle série de modifications, cette fois aérobiqnes, dont les acides pyruvique, succinique, formique, fumarique, malique sont des stades intermédiaires possibles. L'interrelation de ces différentes substances est encore hypothétique et n'a pas fait, pour le cristallin tout au moins, l'objet de recherches expérimentales; mais il est acquis dès maintenant que ces acides sont présents dans cet organe (17, 18, 19). Le cristallin contient de plus une faible quantité d'acide citrique (19) dont la place dans le métabolisme est incertaine.

La simple démonstration de la présence de ces acides n'est pas une preuve absolue de leur rôle dans le métabolisme: leur existence pourrait être attribuée à un phénomène de diffusion. Toutefois le cristallin possède les enzymes correspondant à la plupart d'entre eux, à savoir, les déhydrogénases des acides lactique, fumarique, malique et citrique. L'existence d'une succinate admise par un auteur est niée par un autre (20, 21).

Ces quelques faits ne sont que des éléments épars d'un édifice complexe. Ces recherches doivent être poursuivies, car une meilleure compréhension du métabolisme hydrocarboné est la base indispensable à l'étude de nombreux problèmes cliniques.

RÉSUMÉ

1° Une méthode de dosage de l'acide formique dans les tissus oculaires est décrite.

2° L'acide formique est présent dans la cornée, l'iris, le cristallin, le corps vitré, la rétine, la choroïde, la sclérotique et le nerf optique.

3° Le rôle possible de l'acide formique dans le métabolisme des hydrates de carbone du cristallin est discuté brièvement.

Littérature.

1. KRAUSE A. C. — Chemistry of the Lens. VIII Lenticular Metabolism. *Arch. of Ophth.*, 17, 468 (1937).
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. — *Official and tentative Methods of Analysis*, Washington D. C., 137 (1925).
3. RIESSER, O. — Beiträge zur Frage der Ameisensäurebildung und - Ausscheidung. I Die Bestimmung der Ameisensäure in reinen Lösungen sowie im Harn, nebst einem neuen Verfahren zur Titration des Kalomels. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 96, 355 (1915-1916).
4. MATTHEWS A. P. — *Principle of Biochemistry*. William Wood and Company, Baltimore, 93, 94 (1936).

5. KAPPELLER, ADLER, R., LAUDA E. — Über ätherlösliche Säuren im Harn bei verschiedener Ernährung. *Biochem. Zeitsch.*, **258**, 429 (1933).
6. VOIT, K., FRIEDRICH H. — Über das Auftreten von Ameisensäure im Harn bei der Apfeldiät. *Klin. Wochenschr.*, **14**, 1792 (1935).
7. BENEDICT, E. M., HARROP G. A. — The Estimation of Formic Acid in Urine. *J. Biol. Chem.*, **54**, 443 (1922).
8. SOREN L. ORKOV. — Untersuchungen über die Natur der ätherlöslichen Säuren des Blutes. *Skand. Arch. Physiol.*, **63**, 255 (1931).
9. DROLLER, H. — Zum Nachweis geringer Mengen von Ameisensäure in Blut und Gewebe, ins besondere in der Haut. *Z. Physiol. Chem.*, **211**, 57 (1932).
10. STEPP W., ZUMBUSCH H. — Studien über den intermediären Kohlehydratstoffwechsel beim Menschen. II Mitt. Über das quantitative Verhalten der Ameisensäure im normalen und pathologischen Blute. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, **134**, 112 (1920).
11. VIALE, G. — Sur le mécanisme d'action de l'insuline. *Arch. Ital. Biol.*, **74**, 131 (1924).
12. SÜLLMANN, H. — Der Kohlehydratstoffwechsel der Linse. I. Mitt. Die Bildung von Phosphorsäureestern in der Linse. *Arch. f. Augenheilk.*, **110**, 303 (1937).
13. WEEKERS ROGER et SÜLLMANN, H. — Beziehungen zwischen Phosphatumsatz und Milchsäurebildung in der Linse. *Arch. Intern. Méd. Exp.* **13**, 483 (1938).
14. BURIAN H., JANIC, D. — Zuckerbestimmung in Kammerwasser und Linse von Kaninchen und Rindern. *Srpski Arch. Lekarst.*, **38**, 210 (1936) u. dtsh. Zusammenfass. 17-18, cité par *Zentrbl. f. ges. Ophth.*, **37**, 85 (1937).
15. FISCHER F. P. — Ernährung und Stoffwechselⁱ der Gewebe des Auges. *Ergeb. d. Physiol.*, **31**, 541 (1931).
16. WEEKERS, ROGER. — L'acide lactique du cristallin. *Arch. d'Ophth.*, **1**, 707 (1937).
17. FISCHER, F. P. — Sur la présence de la vitamine B₁ dans le cristallin et sa signification. *Arch. d'Ophth.*, **2**, 108 (1938).
18. KRAUSE, A. C. — *Americ. Journ. Ophth.* (sous presse).
19. KRAUSE, A. C. STACK, A. M. (en préparation).
20. ADAMS, D. — Investigation on the Crystalline Lens. *Proc. Roy. Soc. London B.*, **98**, 244 (1925).
21. AHLGREN G. — On the Oxidation Mechanism of the Crystalline Lens. *Acta Ophth.*, **5**, 1 (1927).

