

LES ACIDES AMINES LIBRES DE L'HUMEUR AQUEUSE ET DU LIQUIDE INTERSTITIEL DU STROMA CORNEEN

PAR

J. FRANCOIS, M. D., M. RABAEY, M. D., N. RECOULES, M. D.

Gand, Belgique

Les données de la littérature concernant l'examen chromatographique sur papier et l'identification des acides aminés libres dans l'humeur aqueuse de l'homme ou de l'animal sont encore assez rares.

Le premier travail est celui de Blaha, Wewalka et Zwiauer (1953), qui comparent, chez le lapin, les acides aminés du serum sanguin à ceux de l'humeur aqueuse. Ils ne trouvent aucune différence significative, ni en ce qui concerne le nombre, ni en ce qui concerne la concentration des acides aminés, et concluent que ceux-ci parviennent dans la chambre antérieure par diffusion, plutôt que par sécrétion.

En utilisant 50 à 150 mm³ d'humeur aqueuse non traitée, ils trouvent que cette dernière contient normalement les acides aminés suivants: glycine, serine, alpha-alanine, leucine, acide glutamique, valine, lysine, arginine, tyrosine, proline et glutamine. En utilisant des plus grandes quantités d'humeur aqueuse (400 mm³), ils trouvent en outre: acide aspartique, acide alpha et gamma-aminobutyrique, thréonine, hydroxy-proline et phenylalanine.

L'hydrolyse acide de l'humeur aqueuse ne produit aucun changement important; le nombre et la concentration des acides aminés restent les mêmes; il y a cependant une augmentation de l'acide glutamique par transformation de son amide, la glutamine. Les auteurs concluent à l'absence, dans l'humeur aqueuse, de peptides à petites molécules.

Wunderly et Cagianut (1954), ainsi que Cagianut (1957) arrivent à des conclusions différents chez l'homme. Normalement, les acides aminés sont moins nombreux et moins concentrés dans l'humeur aqueuse que dans le serum sanguin; la même observation a d'ailleurs été faite pour le liquide céphalo-rachidien.

L'humeur aqueuse normale, déprotéinée par l'éthanol, contient surtout des acides aminés aliphatiques à poids moléculaire faible: c'est l'alanine qu'on trouve toujours en plus grande quantité; la leucine, la lysine, parfois même la méthionine et la théonine peuvent être identifiées, mais en faible concentration. Dans les cas pathologiques (irido-cyclites), on constate une augmentation générale des acides aminés et l'apparition d'acide glutamique, d'histidine et de valine.

Steiger (1957) étudie, chez l'homme, les acides aminés obtenus après hydrolyse des fractions protéiniques de l'humeur aqueuse, du cristallin et du serum sanguin. Il trouve des différences importantes: l'acide glutamique, l'arginine et l'alanine sont plus abondants dans l'humeur aqueuse, alors que la lysine est plus concentrée dans le serum.

Comme les résultats des différents auteurs ne sont pas entièrement concordants, nous avons cru intéressant de reprendre l'étude des acides aminés libres par la chromatographie sur papier non seulement dans le serum sanguin et l'humeur aqueuse, mais également dans le liquide interstitiel du stroma cornéen.

Technique

Nos différentes matières premières proviennent du boeuf.

Le *serum sanguin* est préalablement déprotéiné par l'acide trichloracétique à 20%.

L'*humeur aqueuse* est examinée:

- a) directement sans traitement préalable;
- b) après avoir été déprotéinée par l'acide trichloracétique à 20% ou par ultrafiltration.

Comme la concentration des acides aminés est moindre dans l'humeur aqueuse que dans le serum, il faut, pour obtenir un chromatogramme convenable, utiliser une plus grande quantité d'humeur aqueuse. Dans ces conditions, les sels en présence ont une action perturbatrice, qui trouble le déplacement des acides aminés. Aussi est-il nécessaire d'éliminer les sels à l'aide d'un échangeur d'ions. Dans ce but, nous utilisons l'amberlite I.R. 120 H. Les acides aminés sont ensuite entraînés par une solution ammoniacale 2 N et soigneusement isolés. Après évaporation à chaleur, le résidu étant dissous dans l'éthanol à 80%.

Les acides aminés du *liquide interstitiel du stroma cornéen* ne peuvent pas être séparés, sans traitement préalable à cause de la présence de sels. Mais, étant donné la quantité minime de matière première, nous ne pouvons pas recourir à un échangeur d'ions. Force nous est d'utiliser une micro-technique pour l'élimination des sels: après avoir amené sur le papier 100 ul de liquide interstitiel de la cornée,

l'élution est faite à l'aide de méthyl-éthyl-cétone-5%. HCL⁰ N. L'extrait est évaporé et le résidu dissous dans 100 ul d'eau bidistillée.

Il faut à ce sujet remarquer qu'il n'est pas impossible que les acides aminés basiques soient parfois retenues sur l'échangeur d'ions utilisé, ce qui pourrait par exemple expliquer l'absence de lysine et d'arginine dans le liquide interstitiel de la cornée.

Por la chromatographie *en deux dimensions* (méthode ascendante), nous utilisons les quantités suivantes de liquide: por le serum 20 ul, 30 ul et 50 ul, pour l'humeur aqueuse 40 ul et 50 ul, por le liquide interstitiel de la cornée, 100 ul.

Les deux dimensions sont réalisées soit avec le mélange butanol-acide acétique et le phénol saturé d'eau, soit avec le butanol-pyridine et le système phénol-éthanol-amoniaque.

La méthionine est identifiée par la peroxydation oxydative.

L'emplacement des acides aminés est révélé par la réaction colorée à la ninhydrine.

Résultats

La concentration des acides aminés est relativement moindre dans l'humeur aqueuse (Fig. 1, 2 et 3) que dans le serum sanguin (fig. 4): alors que 30 ul de

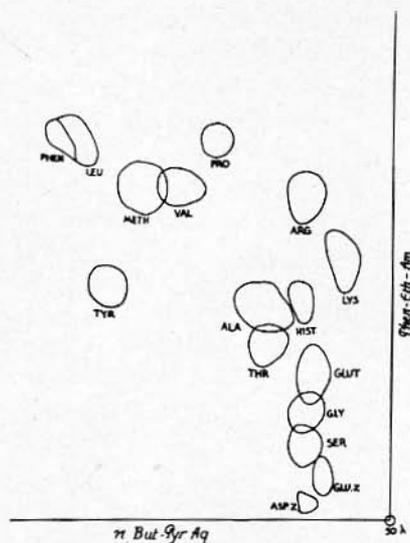


Fig. 1. Humeur aqueuse de boeuf (50 ul). Chromatographie en deux dimensions, sans traitement préalable.

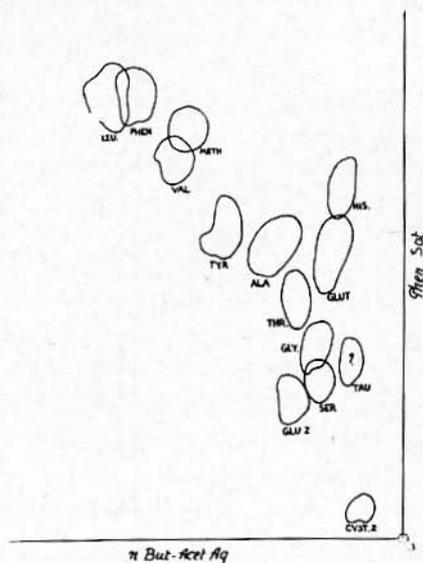


Fig. 2. Humeur aqueuse de boeuf (50 ul). Chromatographie en deux dimensions, sans traitement préalable.

serum suffisent pour obtenir un chromatogramme convenable, il faut 50 ul d'humeur aqueuse pour obtenir le même résultat.

Nous avons pu identifier un grand nombre d'acides aminés (18): acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycine, thréonine, glutamine, tyrosine, alanine, lysine, histidine, arginine, proline, méthionine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, peut-être histidine.

Le tableau suivant permet de comparer la concentration des différents acides aminés dans le serum, l'humeur aqueuse et le liquide interstitiel de la cornée.

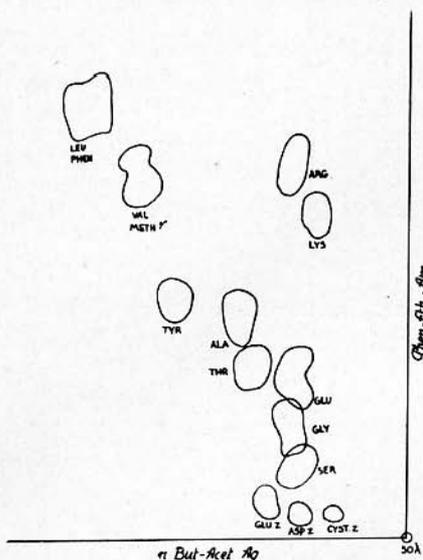


Fig. 3. Humeur aqueuse de boeuf (30 ul). Chromatographie en deux dimensions après traitement à l'acide trichloracétique.

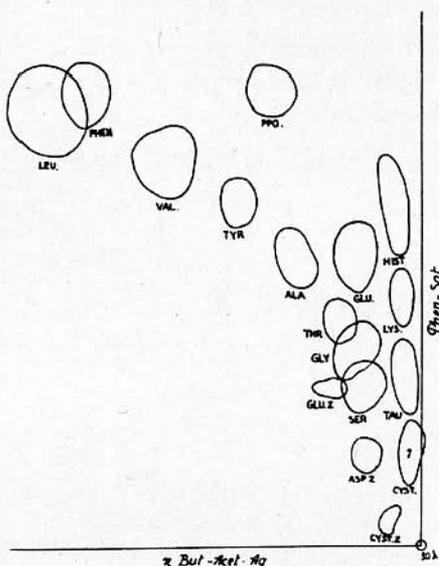


Fig. 4. Serum sanguin de boeuf (30 ul). Chromatographie en deux dimensions après traitement à l'acide trichloracétique et élimination des sels.

Dans l'humeur aqueuse (Fig. 1, 2 et 3) nous trouvons:

1. En forte ou très forte concentration: alanine et glutamine, méthionine, valine, leucine et iso-leucine, ce qui correspond en grande partie aux observations de Wunderly et Cagianut (1954) chez l'homme.
2. En concentration modérée: phénylalanine sérine et glycine.
3. En faible concentration: acide aspartique, acide glutamique, thréonine, tyrosine, lysine, histidine, arginine, proline, peut-être acide cystéique et taurine.

Dans le liquide interstitiel de la cornée, (Fig. 5), on trouve:

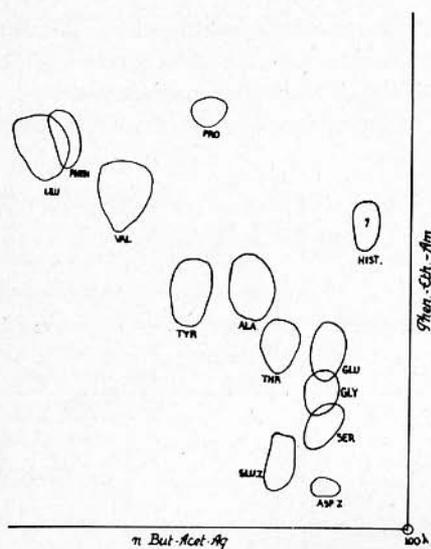


Fig. 5. Liquide interstitiel du stroma cornéen (100 μ l). Chromatographie en deux dimensions après éfution à l'acide de méthyl-éthyl-cetone 5%. HCL-6N.

1. En très forte concentration: alanine.
2. En forte concentration: glutamine et acide glutamique, dont la concentration respective varie, sans raison connue, d'un chromatogramme à l'autre, valine et leucine.
3. En concentration modérée: sérine et glycine.
4. En faible concentration: acide aspartique, thréonine, tyrosine, proline, phénylalanine et peut-être histidine.

De ces faits, nous pouvons conclure:

1. Chez le boeuf la concentration des acides aminés libres est plus petite dans l'humeur aqueuse et surtout dans le liquide interstitiel de la cornée que dans le sérum sanguin.

2. L'acide glutamique se trouve en beaucoup plus forte concentration dans le liquide interstitiel de la cornée que dans l'humeur aqueuse ou le serum. Il faut rappeler à ce propos que l'acide glutamique est un constituant du glutathion, qui participe aux phénomènes d'oxydo-réduction, et que, se trouvant au carrefour du métabolisme azoté, il occupe une position importante dans les échanges intermédiaires.

3. La méthionine se trouve en forte concentration dans l'humeur aqueuse, alors qu'elle est absente dans le liquide interstitiel de la cornée et le serum. Rappelons à ce sujet que la méthionine, le plus important des acides aminés soufrés, joue un

rôle physiologique considérable dans le métabolisme intermédiaire grâce à la trans-méthylation. Elle constitue, en effet, avec la choline, la principale source de groupements méthyles mobiles: c'est ainsi qu'elle est à la base de la transméthylation de la glycoeyamine en créatine et de la diméthylcolamine en choline. Elle participe en même temps à la synthèse de la cystéine.

4. Quant aux autres acides aminés nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre l'humeur aqueuse, le liquide interstitiel de la cornée et le sérum sanguin.

<i>Acides aminés</i>	<i>Serum sanguin</i>	<i>Humeur aqueuse</i>	<i>Liquide interstitiel de la cornée</i>
Cystine	**	—	—
acide cystéique	—	*	—
acide aspartique	**	*	**
acide glutamique	**	**	****
taurine	**	** (?)	—
sérine	**	**	**
glycine	****	**	**
thréonine	**	**	**
glutamine	****	****	****
tyrosine	**	**	**
alanine	****	****	****
lysine	**	**	—
histidine	**	**	** (?)
arginine	—	**	—
proline	**	**	**
méthionine	—	****	—
valine	****	****	****
leucine	****	****	****
phénylalanine	**	**	**
iso-leucine	—	****	—

* = concentration très faible.
 ** = faible
 *** = modérée
 **** = forte
 ***** = très forte

Resumé

1. Chez le boeuf, la concentration des acides aminés libres est plus petite dans l'humeur aqueuse et surtout dans le liquide interstitiel de la cornée que dans le sérum sanguin.

2. L'acide glutamique se trouve en beaucoup plus forte concentration dans le liquide interstitiel de la cornée que dans l'humeur aqueuse ou le sérum.

3) La méthionine se trouve en forte concentration dans l'humeur aqueuse, alors qu'elle est absente dans le liquide interstitiel de la cornée et le sérum.

4. Quant aux autres acides aminés, il n'y a pas de différences significatives entre l'humeur aqueuse, le liquide interstitiel de la cornée et le serum sanguin.

Summary

1. In the ox, concentration of the free amino acids is less in aqueous humour and especially in interstitial liquid of the cornea, than in serum.

2. Glutamic acid is in much higher concentration in interstitial liquid of the cornea than in aqueous humour or serum.

3. Methionine is in high concentration in aqueous humour, but absent in interstitial liquid of the cornea and in serum.

4. With regard to the other amino acids, there are no significant differences between aqueous humour, interstitial liquid of the cornea and serum.

Clinique Ophthalmologique Universitaire

BIBLIOGRAPHIE

BLAHA H., WEWALKA F. et ZWIAUER A., Untersuchungen ueber die freien Aminosäuren im Kammerwasser des Kaninchens. *Klin. Mbl. Augenh.*, **123**, 552-555, 1953.

BLOCK R. J., R. LE STRANGE et G. ZWEIG, Paper chromatography (A Laboratory Manual). Ed. Academic Press, New-York, 1952.

CAGIANUT B., Die freien Aminosäuren im menschlichen Kammerwasser. *Documenta Ophthalm.*, **11**, 242-251, 1957.

CRAMER Fr., Papierchromatographie. Ed. Verlag Chemie, Gmbh., Weinheim|Bergstr., 1953.

LEDERER E. et LEDERER M., Chromatography. Ed. Elsevier, Amsterdam, 1957.

SMITH I., Chromatographic Techniques (Clinical and Biochemical Applications). Ed. William Heinemann, Londres.

STEIGER R., Die Aminosäuren der Kammerwasser proteine. *Documenta Ophthalm.*, **11**, 237-241, 1957.

WUNDERLY C. et CAGIANUT B., Free Amino-acids in the human aqueous humour. *Brit. J. Ophth.*, **38**, 357-363, 1954.