

ACTIVITES ENZYMATIQUES DE LA RETINE ET
ANTHOCYANOSIDES EXTRAITS DE *VACCINUM
MYRTILLUS* (LACTATE-DESHYDROGENASE,
 α -HYDROXYBUTYRATE-DESHYDROGENASE,
6-PHOSPHOGLUCONATE-DESHYDROGENASE,
GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE,
 α -GLYCEROPHOSPHATE-DESHYDROGENASE,
5-NUCLEOTIDASE, PHOSPHO-GLUCOSE-ISOMERASE)

C. CLUZEL,* P. BASTIDE, R. WEGMAN et P. TRONCHE

C.N.R.S., Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie,
Clermont-Ferrand, et Faculté de Médecine, Paris, France

(Received 20 November 1969; accepted 10 February 1970)

Abstract—The influence of the anthocyanosides extracted from the *Vaccinium myrtillus* on some retinal enzyme activities was studied *in vitro* in the pig and *in vivo* in the rabbit. Following previous works on the improvement of the regeneration of the visual purple, after administration of anthocyanosides and on the retinal metabolism in presence of anthocyanosides, this study shows at the level of the retina, a significant increase in lactate dehydrogenase, α -hydroxybutyrate dehydrogenase, 6-phospho-gluconate dehydrogenase and α -glycerophosphate dehydrogenase a steady state of the phospho-glucose isomerase, glucose-6-phosphatase and glucose-6-phosphate dehydrogenase; a decrease in the 5-nucleotidase, phospho-glucomutase NAD retinol-oxydase.

These findings obtained by *in vivo* and *in vitro* biochemical techniques confirm some results previously found by the histo-enzymological procedure.

IL N'EXISTE pratiquement pas de données bibliographiques sur l'effet des glycosides d'anthocyanes sur les réactions enzymatiques. On connaît cependant l'aptitude de ces pigments végétaux à former des sels de flavylum, à libérer des protons, à se lier à des métaux, à s'associer à d'autres substances et même à des macromolécules.¹ Les produits envisagés dans la présente étude sont des glycosides de cyanidol, delphinidol, pétunidol, malvidol retirés de *Vaccinium myrtillus*.²

Nous avons, dans des études précédentes,³⁻⁵ constaté que ces glycosides d'anthocyanes favorisaient la régénération de la rhodopsine dans l'oeil du lapin. Nous avons à cette occasion, évoqué un effet possible sur les systèmes enzymatiques intervenant dans la régénération de la rhodopsine, en particulier, la rétinène-*cis-trans* isomérase et la NAD rétinol oxydase. L'effet des glycosides d'anthocyanes sur cette dernière activité a été récemment envisagé par nous.⁶ Toutes ces raisons nous ont conduits à rechercher d'un façon plus systématique les variations de quelques activités enzymatiques rétiniennes tant du point de vue histochimique⁷ que biochimique.⁸

* Stagiaire de Recherche au C.N.R.S.; avec la collaboration de H. DELILLE, Aide-biologiste au C.N.R.S.

Nous rapportons ici les résultats de l'étude biochimique des activités lactate-déshydrogénasique (1.1.1.27), α -hydroxybutyrate-déshydrogénasique (1.1.1.30) 6-phospho-gluconate-déshydrogénasique (1.1.1.43), glucose-6-phosphate-déshydrogénasique (1.1.1.49), α -glycérophosphate-déshydrogénasique (1.1.99.5), 5-nucléotidasique (3.1.3.5), phospho-glucose-isomérasique (5.3.1.9), *in vitro* chez le Porc et *in vivo* chez le Lapin.

TECHNIQUE

Les préparations enzymatiques proviennent soit d'homogénats de rétines de Porc, pour l'étude *in vitro*, soit d'homogénats de rétines de Lapin fauve de Bourgogne pour l'étude *in vivo*.* Après sacrifice des animaux et prélèvement des rétines à la lumière, les homogénats sont effectués à l'Ultra-Turrax puis dilués.

Les techniques enzymologiques mises en oeuvre sont respectivement celles de Cabaud et Wroblewski⁹ modifiée par Bastide *et al.*¹⁰ pour la lactate-déshydrogénase; Rosalki¹¹ modifiée par Bastide *et al.*¹² pour l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase; King¹³ pour la 6-phosphogluconate-déshydrogénase; Kornberg et Horecker,¹⁴ modifiée par Bastide *et al.*¹⁵ pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase; Nachlas *et al.*⁶³ modifiée, pour l' α -glycérophosphate-déshydrogénase; Campbell¹⁷ pour la 5-nucléotidase; Bodansky,¹⁸ modifiée par Bastide *et al.*,¹⁹ pour la phosphoglucose isomérase.

Les *anthocyanosides* extraits de *Vaccinium myrtillus*[†] sont soit introduits dans les milieux d'incubation, aux doses de 0,5 et 1,0 mg par essai enzymatique, avec les homogénats de rétines de Porc; soit administrés au lapin, à raison de deux doses de 100 mg/kg de poids corporel, dans la veine marginale de l'oreille, 24 hr et 1 hr avant le sacrifice de l'animal. Certaines enzymes telles la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et la 6-phospho-gluconate déshydrogénase n'ont pu être suivies qu'*in vivo* pour des raisons techniques.

RESULTATS

Les résultats expérimentaux moyens M, accompagnés de la valeur α donnant l'intervalle de confiance 95 p. 100 d'après la distribution de Student, figurent dans les tableaux 1 à 7. Ils sont exprimés en pourcentages de substrat métabolisé dans les conditions expérimentales. De l'examen de ces résultats, il ressort que les anthocyanosides extraits de *Vaccinium myrtillus* entraînent:

(1) une élévation des activités enzymatiques rétinienne tant *in vitro* qu'*in vivo* en ce qui concerne la lactate déshydrogénase (+40 p. 100 et +23 p. 100), l' α -hydroxybutyrate-déshydrogénase (+20 p. 100 et +30 p. 100), l' α -glycérophosphate-déshydrogénase (+20 p. 100), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (+15 p. 100).

(2) une diminution de la 5-nucléotidase rétinienne *in vitro* (-30 p. 100).

(3) un maintien de la phosphoglucose-isomérase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase rétinienne.

Il nous faut rappeler ici, en ce qui concerne le métabolisme du glucose-6-phosphate, que nous avions précédemment décelé dans des conditions expérimentales identiques,⁸ tant *in vitro* qu'*in vivo*, la quasi absence de modifications de l'activité glucose

* Nous tenons à remercier les Laboratoires CHIBRET pour leur obligeance à nous fournir les yeux de Porc et les lapins expérimentés.

† Anthocyanosides extraits de *Vaccinium myrtillus*: Difrarel®, Laboratoires CHIBRET, 200 Bd Etienne Clémentel, Clermont-Ferrand, France.

TABLEAU 1. ACTIVITÉ LACTATE-DÉHYDROGÉNASIQUE: L.D.H.

A. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE PORC APRÈS ADDITION *IN VITRO* D'ANTHOCYANOSIDES (80 RÉTINES)

Homogénats au		1/250		1/500		1/1000	
Temps d'incubation (min)	Antho-cyanosides (mg par essai)	M	α	M	α	M	α
15	0,0	34,1	10,0	13,8	7,6	9,0	3,0
	0,1	53,2	18,8	25,0	7,6	18,4	7,6
	0,5	55,0	16,7	27,6	7,8	20,1	7
	0,0	52,1	15,1	20,0	7,1	12,3	6,2
30	0,1	70,0	13,3	35,0	8,4	19,4	9,2
	0,5	71,4	12,2	38,0	7,2	19,0	11,6

B. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg par kg) à 24 hr D'INTERVALLE (28 RÉTINES)

Homogénats au		1/500		1/1000		1/2000	
Temps d'incubation (min)		M	α	M	α	M	α
15	Témoins	28,0	4,3	17,1	3,1	10,1	3,1
	Traités	34,1	6,3	19,4	3,7	11,2	4,0
30	Témoins	43,2	3,9	27,0	3,7	15,1	3,7
	Traités	53,4	4,7	29,2	3,5	19,3	4,5

TABLEAU 2. ACTIVITÉ α -HYDROXYBUTYRATE DÉHYDROGÉNASIQUE: α H.B.D.H.A. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE PORC APRÈS ADDITION, *IN VITRO*, D'ANTHOCYANOSIDES (98 RÉTINES)

Homogénats au		1/100		1/200		1/500	
Temps d'incubation (min)	Antho-cyanosides (mg par essai)	M	α	M	α	M	α
30	0,0	55,4	13,5	30,0	10,2	8,0	5,5
	0,5	58,5	15,6	35,9	11,2	9,9	4,3
	1,0	62,4	13,4	39,2	12,4	16,0	11,2
	0,0	72,3	9,0	45,3	14,8	17,0	8,0
60	0,5	74,2	13,2	46,4	13,5	19,1	4,0
	1,0	77,1	11,6	49,1	15,2	26,2	9,2

B. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg par kg) à 24 hr D'INTERVALLE (28 RÉTINES)

Homogénats au		1/200		1/400	
Temps d'incubation (min)		M	α	M	α
30	Témoins	21,1	2,8	7,1	2,1
	Traités	27,3	4,6	13,3	2,3
60	Témoins	47,2	3,8	17,5	2,2
	Traités	48,9	5,6	27,9	2,1

TABLEAU 3. ACTIVITÉ 6-PHOSPHOGLUCONATE DÉHYDROGÉNASIQUE
POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg
par kg) À 24 hr D'INTERVALLE (28 RÉTINES)

Homogénats au		1/250		1/500		1/1000	
Temps d'incu- bation (min)		M	α	M	α	M	α
1	Témoins	15,5	2,3	7,8	1,1	4,5	0,8
	Traités	19,0	1,8	9,0	0,8	5,0	0,8
5	Témoins	27,0	3,0	13,6	3,0	6,4	1,4
	Traités	32,1	1,6	16,3	0,8	8,1	0,8
10	Témoins	35,9	4,1	19,3	3,4	8,7	1,8
	Traités	41,0	1,4	21,3	1,1	11,0	2,3

TABLEAU 4. ACTIVITÉ GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DÉHYDROGÉNASIQUE
POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg
par kg) À 24 hr D'INTERVALLE

Homogénats au		1/250		1/500		1/1000	
Temps d'incu- bation (min)		M	α	M	α	M	α
1	Témoins	6,0	2,1	2,0	0,8	1,0	0,8
	Traités	4,0	1,1	3,0	0,8	1,0	0,8
5	Témoins	16,0	1,4	8,0	1,4	4,0	1,6
	Traités	16,0	1,3	10,0	1,1	5,0	1,4
10	Témoins	28,0	3,0	14,0	1,4	8,0	1,8
	Traités	28,0	2,7	16,0	0,8	9,0	0,8

TABLEAU 5. ACTIVITÉ α -GLYCÉROPHOSPHATE DÉHYDROGÉNASIQUE
A. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
PORC APRÈS ADDITION *IN VITRO* D'ANTHOCYANOSIDES (80 RÉTINES)

Homogénats au		1/5		1/10		1/20	
Temps d'incu- bation (min)	Antho- cyanosides (mg par essai)	M	α	M	α	M	α
15	0,0	33,1	7,8	20,0	4,8	11,1	2,6
	0,1	34,2	12,6	21,2	5,5	12,4	3,8
	0,5	37,0	15,1	23,4	5,2	13,9	2,9
	0,0	52,3	14,0	30,0	6,0	16,2	2,0
30	0,1	56,9	12,6	32,9	5,3	18,1	2,8
	0,5	64,0	6,8	33,1	5,4	19,8	2,9

B. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg
par kg) À 24 hr D'INTERVALLE (28 RÉTINES)

Homogénats au		1/10		1/20		1/40	
Temps d'incu- bation (min)		M	α	M	α	M	α
15	Témoins	23,3	5,0	16,1	4,2	9,8	2,5
	Traités	28,0	4,8	19,0	3,9	13,2	2,5
30	Témoins	29,0	6,1	20,2	3,5	13,3	2,1
	Traités	35,1	7,9	24,1	5,6	17,1	5,0

TABLEAU 6. ACTIVITÉ 5-NUCLÉOTIDASIQUE: A.M.P. ASE
POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
PORC APRÈS ADDITION *IN VITRO* D'ANTHOCYANOSIDES (100 RÉTINES)

Temps d'incubation (hr)	Antho-cyanosides (mg par essai)	1/50		1/100		1/200	
		M	α	M	α	M	α
1/2	0,0	24,0	1,0	12,0	0,4	6,0	3,2
	0,1	22,5	2,5	12,5	0,6	5,6	0,7
	0,5	21,5	2,1	8,8	1,1	1,0	0,6
	1,0	14,8	2,7	2,7	1,0	1,3	0,6
	0,0	46,1	2,4	23,5	1,1	11,3	1,2
1	0,1	47,8	2,9	24,0	1,4	11,2	0,6
	0,5	43,3	2,0	16,1	2,4	11,0	1,2
	1,0	29,3	3,8	5,3	1,0	1,3	0,3

TABLEAU 7. ACTIVITÉ PHOSPHOGLUCOSE ISOMÉRASIQUE: PHI
A. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
PORC APRÈS ADDITION *IN VITRO* D'ANTHOCYANOSIDES (80 RÉTINES)

Temps d'incubation (min)	Antho-cyanosides (mg par essai)	1/1000		1/2000		1/4000	
		M	α	M	α	M	α
5	0,0	24,2	2,0	15,1	2,0	9,8	1,1
	0,1	24,1	2,4	15,3	1,7	10,2	1,2
	0,5	25,4	2,0	16,2	1,6	10,4	1,2
	0,0	28,5	1,9	23,5	1,3	16,1	1,7
15	0,1	29,3	2,3	21,6	2,1	16,3	2,2
	0,5	30,2	1,8	22,1	1,8	16,1	1,7

B. POURCENTAGES DE SUBSTRAT MÉTABOLISÉ PAR LES HOMOGÉNATS DE RÉTINES DE
LAPIN APRÈS DEUX INJECTIONS INTRA-VEINEUSES D'ANTHOCYANOSIDES (100 mg
par kg) À 24 hr D'INTERVALLE (28 RÉTINES)

Temps d'incubation (min)		1/500		1/1000		1/2000	
		M	α	M	α	M	α
5	Témoins	31,2	3,4	21,2	4,4	14,1	3,3
	Traités	29,8	3,9	18,7	3,5	13,8	1,4
	Témoins	33,1	3,9	30,1	3,9	22,4	3,7
	Traités	32,9	4,9	28,8	3,2	20,9	2,2

6-phosphatasique (+12 p. 100 et +0 p. 100) et une diminution de l'activité phosphoglucomutrasique rétinienne (-21 p. 100 et -18 p. 100). Les anthocyanosides ouvrent la voie vers le glucose libre, sans inhiber l'entrée dans la voie glycolytique dont ils élèvent l'activité terminale en anaérobiose; de plus, ils stimulent la voie métabolique du shunt des hexoses-phosphates de Dickens et Horecker au niveau de la 6-phospho-

gluconate-déshydrogénase. Il est à noter que nous avions également montré que l'effet favorable des anthocyanosides sur la régénération du pourpre rétinien ne semblait pas se situer au niveau d'une stimulation du système NAD-rétinol-oxydasique.⁶

DISCUSSION

L'activité lactate déshydrogénasique (L.D.H.) a été individualisée par voie histo enzymologique au niveau de la rétine par Lowry *et al.*²¹ Cogan *et al.*,²² Nasu *et al.*,²³ Mizuki,¹⁶ avec un maximum d'activité dans les fibres de Muller, les cellules gliales et les cellules ganglionnaires.

Cette activité a été suivie biochimiquement chez le Boeuf par Bastide *et al.*²⁴ et chez le Lapin par Uyeda.²⁵ Cinq isoenzymes ont été séparées par Graymore,^{26 27} et Matsuda.²⁸

Parmi les variations physiopathologiques de la LDH rétinienne, il faut citer: une élévation au cours de la croissance chez le Rat, Graymore²⁷ ou après cortisone, Centanni,²⁹ et une diminution lors de dystrophie ou de dégénérescence des cellules photo-réceptrices chez la Souris, le Rat et le Lapin, Graymore^{26,27} Bonavita *et al.*³⁰ Pfersch *et al.*,²⁰ Schimke.³¹

Cette diminution est retrouvée après injection intra-veineuse d'iodoacétate de sodium chez le Lapin par De Berardinis,³² alors qu'il n'y aurait aucun changement pour Forgacs³³ et pour Vecchione *et al.*³⁴ La LDH rétinienne diminue chez le Chat lors de rétinite pigmentaire, Meier-Ruge et Cerletti³⁵ Fujiwara et Nasu.³⁶ La LDH rétinienne demeure inchangée dans le diabète alloxanique du Rat, Newell et Kurimoto.³⁷ Elle s'élève dans le liquide sous-rétinien lors de décollements de la rétine, Richter et Vetter,³⁸ Wittmer *et al.*³⁹

Hasegawa⁴⁰ suit les variations de la LDH rétinienne après injection de dextrane-fer. Il note une baisse de la LDH au niveau des fibres basales de Muller des cones dès la 3ème heure, suivis d'une élévation enzymatique au 10ème jour. D'après Fowlks,⁴¹ après illumination et irradiation de la rétine de Lapin par IR de forte intensité (2.10⁶ ergs par cm² par sec) durant 5 min, la LDH présente une élévation de 13 p. 100.

L'activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique de la rétine a déjà été signalée par nous-mêmes⁴² chez les bovidés ou la teneur en LDH de la rétine est plus élevée que celle décelée chez le Porc et avoisine celle du Lapin.

L'activité 5-nucléotidasique de la rétine est plus élevée que celle de l'iris du corps ciliaire et du vitré ainsi que l'ont observé Reis⁴³ chez l'Homme, Akiya,⁴⁴ chez le Boeuf, Majima⁴⁵ chez le Lapin et chez le Boeuf; Lessel et Kuwabara⁴⁶ chez le Veau, le Lapin, le Porc, le Chien, le Cobaye et chez l'Homme. Après injection intra-veineuse quotidienne d'iodate de sodium chez le Lapin, Shionoya⁴⁷ note, durant les deux premiers jours, une diminution de la 5-nucléotidase, suivie ensuite d'une élévation.

L'activité phosphoglucose-isomérasique avait été étudiée par l'un d'entre nous²⁴ dans les rétines de bovidés où il avait été noté une élévation chez l'animal agé.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase est plus marquée dans la rétine de Lapin élevé à l'obscurité totale depuis la naissance, selon Schimke.³¹ La présence de cette enzyme dans les rétines de souris, de rats, de cobayes, de lapins, de bovidés a été signalée par de nombreux auteurs: Kuwabara et Cogan⁴⁸ Niemi et Merenmies,⁴⁹ Lowry *et al.*,⁵⁰ Heath *et al.*,⁵¹ Calabria et Orzalesi,⁵² Bastide, Tronche *et al.*,¹⁵ Hasegawa.⁵³

La 6-phosphogluconate déshydrogénase, ainsi que la glucose-6-phosphate déshydro-

génase ont été décelées dans les rétines de bovidés par De Berardinis.³² Elles ne varient pas dans les rétines de Rat soumis au diabète alloxanique d'après Heath *et al.*⁵¹

L'a-glycérophosphate déshydrogénase est faible dans la rétine de Rat ainsi que l'ont signalé Graymore et Towlson,²⁷ elle augmente au cours du développement mais ne jouerait pas de part importante dans la réoxydation du NADH₂ produit par la glycéraldéhydephosphate-déshydrogénase; cette réoxydation faisant intervenir le système de la lactate-déshydrogénase.

L'examen du *métabolisme rétinien* chez les Mammifères a conduit Eutterman et Kinoshi,⁵⁴ Everson,⁵⁵ Levene *et al.*⁵⁶ à admettre que la rétine utilise le glucose essentiellement par la glycolyse et subsidiairement par le cycle citrique, alors que le métabolisme lipidique ne joue pratiquement ici qu'un faible rôle énergétique. D'après Duke Elder⁵⁷ le rôle du shunt des hexoses monophosphates dans l'utilisation rétinienne du glucose, de moyenne importante dans les conditions normales, devient plus marqué dans les processus pathologiques, en particulier, au niveau des cellules visuelles où il est plus électivement localisé. Dans une récente étude histo-enzymologique des enzymes rétinienne de lapins ayant reçus des anthocyanosides, nous avons montré⁷ que les modifications métaboliques de la rétine portaient non pas seulement sur l'alcool déshydrogénase qui présente alors une teneur élevée, mais sur toute une série d'activités enzymatiques, un effet spécifique, des anthocyanosides résidant dans la stimulation de la lactate déshydrogénase, de l'acide lipoïque déshydrogénase et de l'alcool déshydrogénase. Ce sont quelques-uns de ces résultats entrevus par voie histo-enzymologique que nous avons précisés et développés par la présente étude biochimique macroscopique tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Résumé—Les auteurs précisent l'influence des anthocyanosides extraits de *Vaccinium myrtillus* sur quelques activités enzymatiques rétinienne tant *in vitro* chez le Porc, qu'*in vivo* chez le Lapin. A la suite de leurs travaux antérieurs sur l'amélioration de la régénération du pourpre rétinien après administration d'anthocyanosides et sur le métabolisme rétinien en présence d'anthocyanosides, ils notent, au niveau de la rétine, une élévation marquée de la lactate déshydrogénase, de l'a-hydroxybutyrate déshydrogénase, de la 6-phosphogluconate déshydrogénase et de l'a-glycérophosphate déshydrogénase; un maintien de la phosphoglucose-isomérase, de la glucose-6-phosphatase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase, une diminution de la 5-nucléotidase, de la phosphoglucomutase, de la NAD rétinol-oxydase.

Ces constatations vérifiées par des techniques biochimiques, tant *in vivo* qu'*in vitro*, viennent confirmer et préciser certains de leurs résultats antérieurs entrevus par voie histo-enzymologique, et complètent l'étude du mode d'action biochimique des anthocyanosides sur les phénomènes visuels au niveau rétinien.

BIBLIOGRAPHIE

1. F. M. DEAN, *Naturally occurring oxygen ring compounds*, Butterworth, London **415** (1963).
2. H. POURRAT, P. BASTIDE, P. DORIER, A. POURRAT et P. TRONCHE, *Chim. Ther.* **2**, 33 (1967).
3. P. BASTIDE, F. ROUHER et P. TRONCHE, *Bull. Soc. Ophtal. Fr.* **68**, 801 (1968).
4. P. TRONCHE, P. BASTIDE et J. KOMOR, *C.R. Soc. Biol.* **161**, 2473 (1967).
5. P. TRONCHE, P. BASTIDE et J. KOMOR, *C.R. Soc. Biol.* **161**, 7995 (1967).
6. B. PLAZONNET, P. BASTIDE et P. TRONCHE, *C.R. Soc. Biol.* **162**, 1490 (1968).
7. R. WEGMAN, K. MAEDA, P. TRONCHE et P. BASTIDE, *Ann. Histochem.* **14**, 237 (1969).
8. C. CLUZEL, P. BASTIDE et P. TRONCHE, *C.R. Soc. Biol.* **163** 147 (1969).
9. P. G. CABAUD et F. WROBLEWSKY, *Ann. J. Clin. Path.* **80**, 234 (1958).
10. P. BASTIDE, J. BAUDON, G. DASTUGUE et J. P. REBIERE, *Ann. Biol. Clin.* **18**, 307 (1960).
11. S. D. ROSALKI, *J. Clin. Path.* **18**, 565 (1962).
12. J. BASTIDE, P. BASTIDE, P. MALET, J. P. TURCHINI et G. DASTUGUE *Ann. Biol. Clin.* **24**, 745 (1966).

13. J. KING, *Pratic. Clin. Enzymol.*, Van Nostrand, 99 (1965).
14. A. KORNBERG et B. L. HORECKER, *Methods in Enzymol.* **1**, 323 (1955).
15. P. BASTIDE, P. TRONCHE et G. DASTUGUE, *C.r. Soc. Biol.* **160**, 328 (1965).
16. K. MIZUKI, *Nippon Ganka Gakkeizasshi* **68**, 1567 (1964).
17. D. M. CAMPBELL, *Biochem. J.* **62**, 34 (1962).
18. O. BODANSKY, *Cancer* **7**, 1191 (1954).
19. P. BASTIDE, M. T. MEUNIER et G. DASTUGUE, *C.R. Soc. Biol.* **156**, 1627 (1962).
20. C. PFERSCH et P. KARLI, *C.R. Soc. Biol.* **157**, 365 (1963).
21. O. H. LOWRY, H. B. ROBERTS, D. W. SCHULZ, J. E. CLOW et J. R. CLARK, *J. biol. Chem.* **236**, 2813 (1961).
22. D. G. COGAN et T. KUWABARA, *Trans. Amer. Ophthal. Soc.* **57**, 153 (1959).
23. N. NASU, G. APPONI et C. L. VIALE, *Z. Zellforsch.* **56**, 188 (1962).
24. G. DASTUGUE, C. BALLADE et P. BASTIDE, *C.R. Soc. Biol.* **157**, 540 (1963).
25. Y. UYEDA, *Folia Ophthalm. Jap.* **17**, 282 (1966).
26. C. N. GRAYMORE, *Biochemistry of the Retina*. Academic Press, New York (1965).
27. C. N. GRAYMORE et M. TOWLSON, *Expl. Eye Res.* **2**, 48 (1963); **3**, 5 (1964).
28. H. MATSUDA, *Folia Ophthal. Jap.* **18**, 526 (1967).
29. L. CENTANNI, *Rass. Ital. Ottal.* **24**, 371 (1955).
30. V. BONAVITA, F. PONTE et G. AMORE, *Mat. Nat.* **34**, 710 (1963).
31. R. T. SCHIMKE, *J. biol. Chem.* **234**, 700 (1959).
32. E. BERARDINIS de, *Rass. Ital. Ottal.* **22**, 345 (1953).
33. J. FORGACS, *Experientia* **19**, 236 (1963).
34. L. VECCHIONE, A. POLZELLA, S. RIWALKI et O. TIERI, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **38**, 185 (1962).
35. U. S. MEIER RUGE et A. CERLETTI, *Ophthalmologia* **151**, 512 (1966).
36. H. FUJIWARA et K. NASU, *Acta Soc. Ophthal. Jap.* **65**, 284 (1968).
37. P. W. NEWELL et S. KURIMOTO, *Brit. S. Ophthal.* **47**, 596 (1963).
38. S. RICHTER et K. VETTER, *Arch. Ophthal.* **167**, 145 (1964).
39. R. WITTMER et A. M. HIRSH-HOFFMANN, *Bull. Soc. Fr. Ophthal.* **8**, 392 (1967).
40. E. HASEGAWA, *Folia Ophthal.* **15**, 494 (1964).
41. W. K. FOWLKS, *Invest. Ophthal.* **7**, 469 (1968).
42. P. BASTIDE, M. C. SOULA, P. TRONCHE et G. DASTUGUE, *C.R. Soc. Biol.* **160**, 2322 (1966).
43. J. L. REIS, *J. Ophthal.* **35**, 149 (1951).
44. S. AKIYA, K. ISHIGURO et K. KANEKO, *Acta Soc. Ophthal. Jap. (Tokyo)* **62**, 979, (1958).
45. Y. MAJIMA, *Nippon Ganka. Gakkeizasshi*, **62**, 186 (1958).
46. S. LESSEL et T. KUWABARA, *Arch. Ophthal.* **71**, 851 (1964).
47. K. SHIONOYA, *Acta Soc. Ophthal. Jap. (Tokyo)* **64**, 612 (1960).
48. T. KUWABARA et D. COGAN, *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 214 (1960).
49. M. NIEMI et MERENMIES, *J. Neurochem.* **6**, 200 (1961).
50. O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS et C. LEWIS, *J. biol. Chem.* **220**, 879 (1956).
51. H. HEATH, A. C. RUTTER et T. C. FLETCHER, *Vision Res.* **3**, 95 (1963).
52. C. A. CALABRIA et N. ORZALES!, *Boll. Soc. Ottal. Biol. Sper.* **40**, 1671 (1964).
53. E. HASEGAWA, *Folia Ophthal. Jap.* **17**, 289 (1966).
54. S. EUTTERMAN et T. M. KINOSH!, *J. biol. Chem.* **234**, 723 (1959).
55. A. G. EVERSON, *Structure of Eye*, Proc. Symposium, New York, 53 (1961).
56. R. LEVENE, G. BORTON et R. RINAUGLER, *Arch. Ophthal.* **72**, 99 (1964).
57. S. DUKE ELDER, *System of Ophthalm.*, H. Kimpton, London, 398, (1968).
58. P. BASTIDE, J. BAUDON, S. MEUNIER et G. DASTUGUE *Path. Biol.* **10**, 445 (1962).
59. P. BASTIDE, G. DASTUGUE, F. ROUHER et P. TRONCHE *Arch. Ophthal.* **22**, 245 (1962).
60. P. BASTIDE, P. TRONCHE, M. C. SOULA et G. DASTUGUE, *Path. Biol.* **15**, 275 (1967).
61. V. BONAVITA, F. PONTE et G. AMORE, *Vision Res.* **3**, 7 (1963).
62. O. H. LOWRY, *Biochemistry of Duping Nervous System* Proc. First Intern. Weurahem Symposium 350 (1954).
63. M. M. NACHLAS, S. I. MARGULIES et A. M. SELIGMAN, *J. biol. Chem.* **235**, 499 (1960).