

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XXXX

1965

N° 1

Annales de Parasitologie, Paris, t. **40**, 1965, n° 1, pp. 1 à 12

MÉMOIRES ORIGINAUX

L'utilisation du principe de xénodiagnostic de E. Brumpt pour des recherches portant sur la cristallisation biologique et pathologique de l'hémoglobine sanguine du Cobaye

Par F. PICK

En ce qui concerne les cristaux de l'hémoglobine du Cobaye, on se rappelle qu'ils ont été découverts en 1849 par K. E. Reichert (19), à l'occasion de l'autopsie d'une femelle morte d'une maladie inconnue.

Reichert a figuré ces cristaux sous forme de tétraèdres indiquant en même temps que ces formes étaient parfois tronquées.

Ces formes cristallines provenant du cadavre ont été vues une deuxième fois, en 1852, par Reichert (20) et aussi par Lehmann (14).

Au cours de la même année, F. Kunde (12) a entrepris le premier de faire cristalliser l'hémoglobine du sang de Cobaye par des moyens physico-chimiques.

A cette fin, Kunde a ponctionné le ventricule droit d'un Cobaye et déposé « une goutte de sang (frais ou vieux jusqu'à cinq jours) sur une lame à microscopie ». Après une légère dessiccation périphérique de la goutte du sang, une lamelle a été déposée. Par la suite, la formation de tétraèdres d'un rouge sanguin intense a pu être observée.

De même, le mélange du sang avec de l'eau sucrée ou additionnée de gomme, ou avec de l'éther a fourni à Kunde des cristaux tétraédriques d'hémoglobine du Cobaye.

Annales de Parasitologie humaine et comparée (Paris), t. **40**, 1965, n° 1

1

En présence de ces préparations de cristaux tétraédriques, Kunde a signalé qu'ils diffèrent essentiellement par leurs propriétés chimiques des cristaux tétraédriques découverts par Reichert.

Il est évident que de telles différences chimiques peuvent exister, car il s'agit, dans les cas de Reichert, d'une cristallisation à partir du cadavre, tandis que dans le cas de Kunde, le sang prélevé était frais et n'a été dénaturé que par des procédés physico-chimiques.

Kunde (12) a mentionné encore une communication personnelle de Lehmann, publiée par la suite par Lehmann (15), à savoir que l'hémoglobine du Rat donne aussi des cristaux tétraédriques, constatation que nous n'avons jamais pu vérifier.

La découverte de cristaux tétraédriques d'hémoglobine du Cobaye par Reichert est accompagnée de la première tentative, réalisée par le même auteur, d'application des méthodes de la cristallographie minéralogique pour caractériser des cristaux protéiques.

C'est dans ce sens que Reichert (19) a procédé aux premières mensurations goniométriques trouvant que les faces des cristaux d'hémoglobine tétraédriques du Cobaye montrent une inclinaison mutuelle qui est de $70^{\circ}31'43''$.

Lehmann (15) a effectué une détermination minéralogique plus poussée portant sur leur appartenance à des systèmes cristallographiques.

Il a signalé avoir rencontré, dans le sang du Cobaye, des formes tétraédriques régulières ou d'autres formes du système régulier, ainsi que, parfois, des cristaux en forme d'octaèdres.

Lehmann (15) n'a pas donné de précision sur ces « autres formes » de « système régulier », et, en ce qui concerne les « octaèdres », nous pensons qu'il s'agissait d'une erreur d'interprétation due à la difficulté de décrire exactement des cristaux trop foncés et jumelés qui, exceptionnellement, peuvent être tronqués au niveau des angles opposés, donnant à première vue l'aspect d'un « octaèdre ».

En 1853, C. G. Lehmann (16) a signalé que, d'après ses dernières observations, on connaît jusqu'alors quatre groupes de cristaux d'hémoglobine : des cristaux prismatiques (Cheval, Chien, Poisson, Hérisson), tétraédriques (Cobaye, Rat, Souris), hexagonaux (Ecurieul exclusivement) et rhomboédriques (Hamster).

D'après V. von Lang (13), il n'existe que deux systèmes cristallographiques de l'hémoglobine, à savoir l'hexagonal et le rhombique (Cobaye).

Des recherches cristallographiques ont amené A. K. Boor (3) à déterminer les formes tétraédriques de l'hémoglobine du Cobaye comme appartenant au système orthorhombique.

Pour standardiser enfin la préparation des cristaux d'hémoglobine, D. L. Drabkin (7) a mis au point, en 1946, une technique, toujours en cours, réunissant des recherches antérieures effectuées en 1853 par Funke (8), en 1867 par Hoppe-Seyler (10), en 1883 par Bücheler, en 1887 par Hüfner (11), en 1895 par Arthus (2), en 1863, par Rollet (21), en 1922 par Heidelberger (9), en 1930 par Boor (3) et en 1942 par Cannan et Reddish (6).

La technique proposée par Drabkin comporte la succession précise des phases suivantes : Citration, centrifugation, lavage, addition de chlorure de sodium, centrifu-

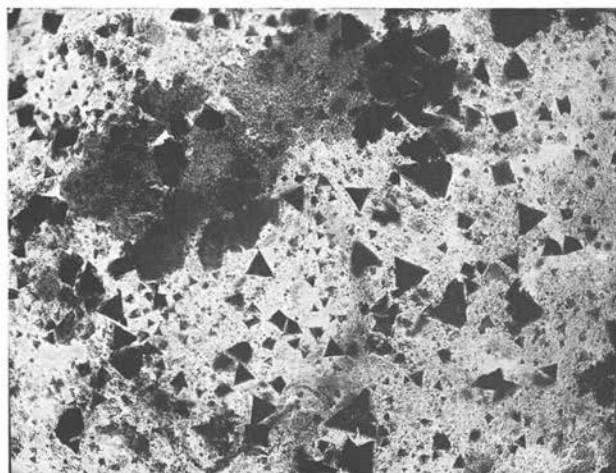


FIG. 1. — Cristallisation biologique de l'hémoglobine sanguine du Cobaye au niveau de l'estomac de *Triatoma infestans*. On constate la présence d'un grand nombre de cristaux tétraédriques et quelques formes composées. La taille des cristaux peut être jugée par rapport aux petits grains du document qui présentent des hématies non lysées.

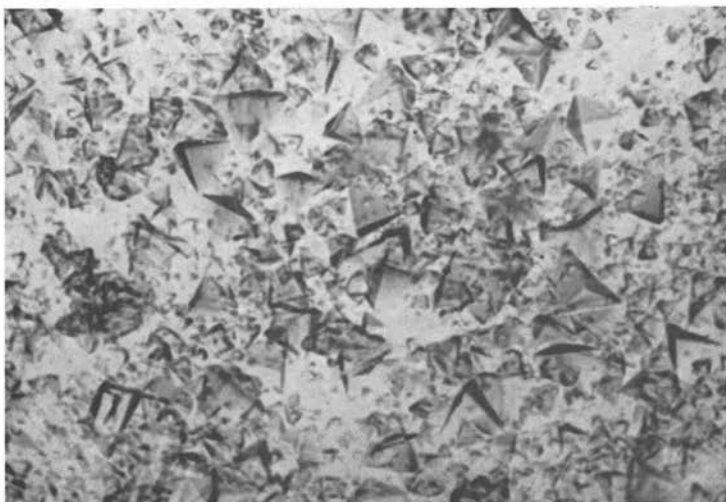


FIG. 2. — Cristallisation biologique de l'hémoglobine sanguine de *Cavia aperea* au niveau de l'estomac de *Triatoma infestans*. On constate la présence de cristaux tétraédriques bien transparents, les formes tronquées faisant défaut. La taille des cristaux peut être jugée par rapport aux hématies non lysées.

gation suivie de trois autres centrifugations successives après addition d'un mélange de chlorure de sodium et d'aluminium, dilution à l'eau distillée, addition de toluène, réfrigération, centrifugation, décantation, concentration à basse température par dialyse sur tampons de phosphate, cristallisation du résidu par addition de sulfate d'ammonium sous contrôle microscopique.

L'interprétation cristallographique des produits de cette technique est effectuée après application de techniques physico-chimiques, optiques, goniométriques, radiologiques et même pétrographiques.

On conçoit facilement qu'on est alors en présence de cristaux obtenus par l'intervention des grands moyens de dénaturation de l'hémoglobine et qu'on essaie d'identifier à l'un des systèmes de la cristallographie minéralogique.

Il est évident que les molécules d'hémoglobine composant de tels cristaux n'ont plus rien à voir avec les molécules dynamiques de l'hémoglobine originale.

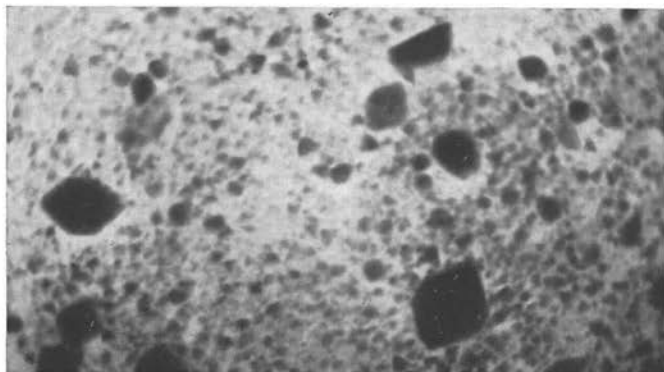


FIG. 3. — Cristallisation biologique indirecte de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye atteint d'une intoxication chronique par le tétrachlorure de carbone. On constate l'aspect hexagonal des cristaux géants de l'hémoglobine. L'axe longitudinal du plus grand cristal du document est de 150 μ .

FIG. 4. — Cristallisation biologique indirecte de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye atteint d'une intoxication chronique par le tétrachlorure de carbone. Forme géante d'un cristal d'hémoglobine donnant, dans la perspective perpendiculaire, un aspect hexagonal. L'axe longitudinal de ce cristal est de 230 μ .

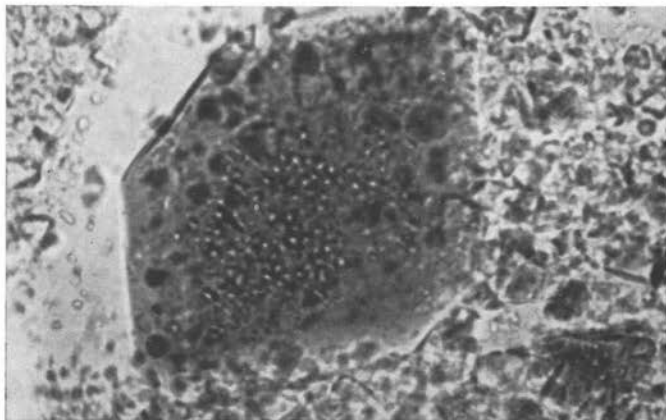




FIG. 5. — Crystallisation biologique indirecte de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye intoxiqué par le tétrachlorure de carbone. Formes d'arborisation des cristaux d'hémoglobine dont le grand axe longitudinal peut atteindre plusieurs centaines de μ .

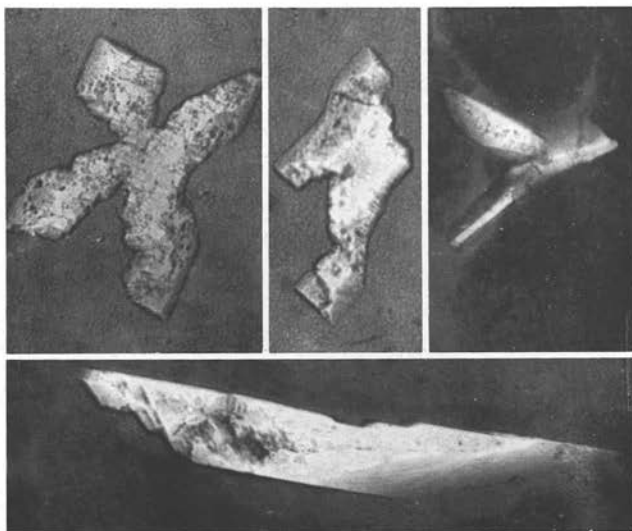


FIG. 6. — Crystallisation biologique indirecte de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye intoxiqué par le tétrachlorure de carbone. Cristaux d'hémoglobine géants et très rigides dont l'aspect rappelle en partie leur dérivation de la trame tétraédrique des cristaux normaux. Le cristal en forme de croix est en train de perdre sa coloration rouge, décoloration qui est encore plus prononcée chez le cristal du milieu, tandis que le cristal du bas est déjà complètement décoloré. Le grand axe longitudinal du cristal du bas est de 1 millimètre.

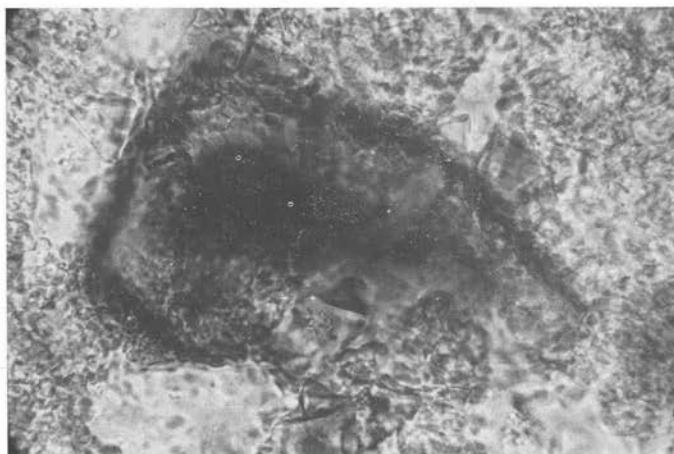


FIG. 7. — Cristallisation biologique de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine. Le cristal géant figuré, de délimitation incomplète, a une extension longitudinale dépassant 500 μ .

Pour pallier ces effets de dénaturation de la molécule de l'hémoglobine, nous avons pensé qu'ils pourraient être éventuellement évités par transvasement biologique du sang du donneur au receveur capable de procéder à la cristallisation de son hémoglobine.

Sur le plan de l'élaboration biologique des cristaux de l'hémoglobine sanguine du



FIG. 8. — Cristallisation biologique de l'hémoglobine sanguine d'un Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine. Le cristal géant, en partie tronqué et de délimitation irrégulière, entouré des cristaux tétraédriques normaux, a une extension longitudinale de 500 μ .

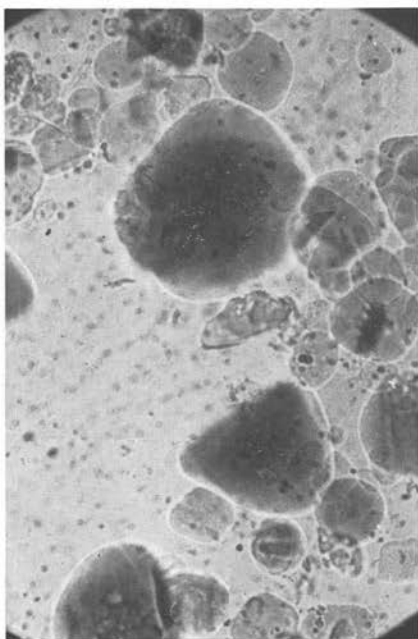


FIG. 9

FIG. 9. — Cristallisation biologique directe de l'hémoglobine sanguine du Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine montrant des formes cristallines arrondies, plus ou moins opaques. La forme géante plus ovale en haut a une extension maxima de 230 μ . La forme géante vers le bas montre l'ébauche d'une configuration triangulaire.

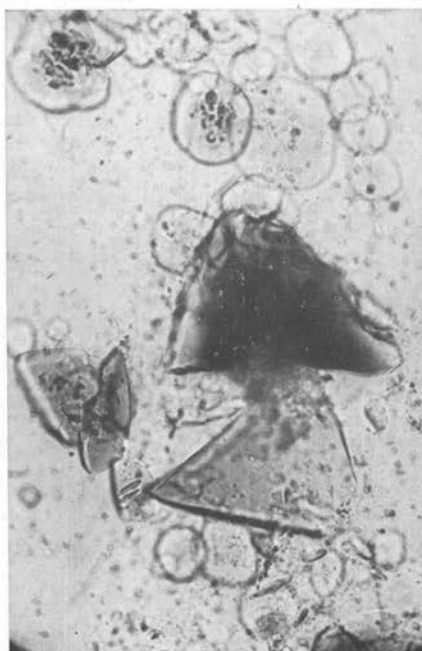


FIG. 10

FIG. 10. — « Cristallisation » biologique directe de l'hémoglobine sanguine du Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine montrant des formes cristallines arrondies et transparentes entourant quelques cristaux de délimitation irrégulière. L'extension de la base du cristal dense du milieu est de 245 μ .

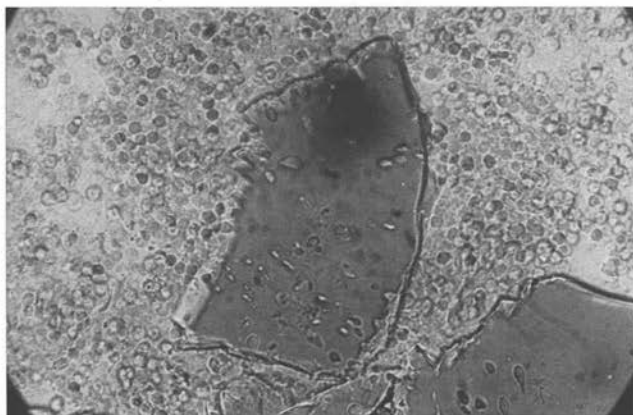
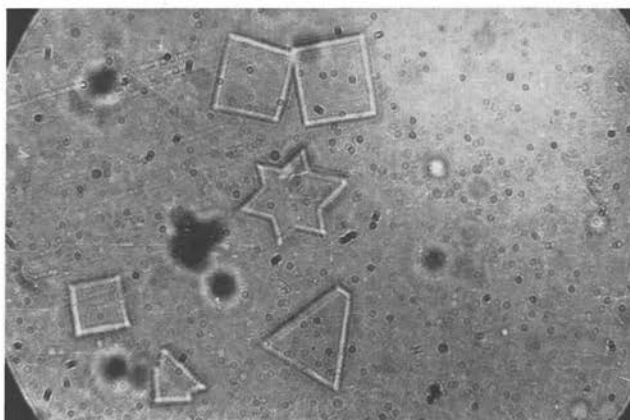


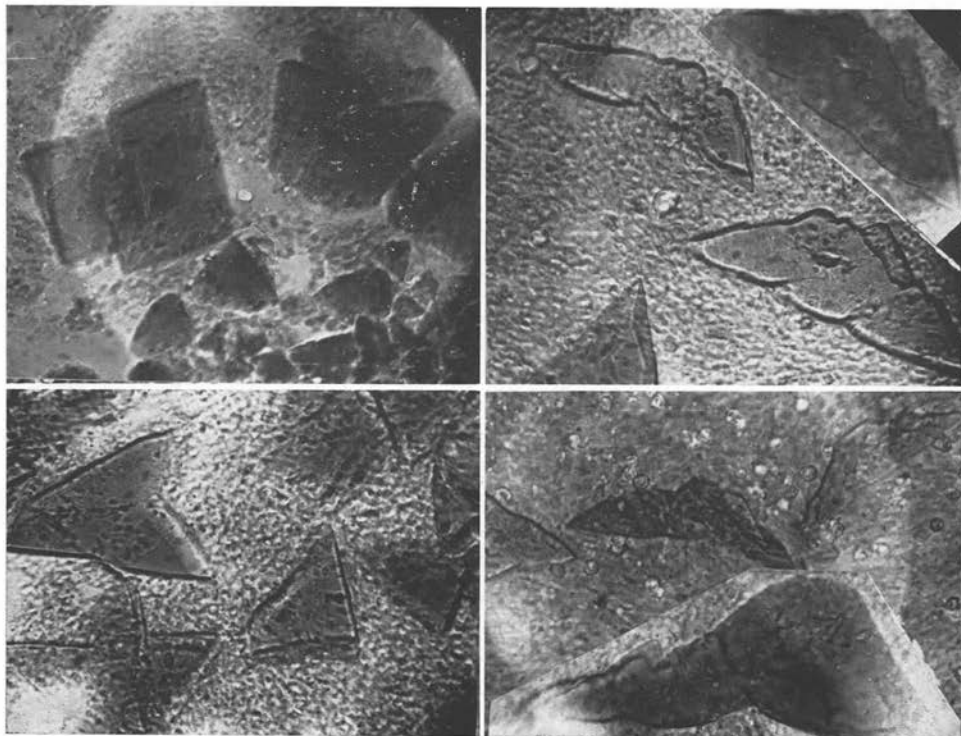
FIG. 11. — Cristallisation post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine du Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine, montrant des cristaux géants incomplets, permettant de reconnaître la dérivation de la forme tétraédrique. L'extension longitudinale du cristal se trouvant au milieu du document est de 193 μ .

FIG. 12. — Cristallisation post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine du Cobaye intoxiqué par la phénylhydrazine, montrant la présence de formes cristallines très minces composées et bien délimitées. La base de la seule forme triangulaire, mais tronquée, est de 80 μ .



a

c/d



b

e/f

FIG. 13. — Photomontage composé de 6 prises différentes (a, b, c/d, e/f) portant sur les cristallisations réduvidiques de l'hémoglobine sanguine du Cobaye infecté par un *Mycobactérium tuberculosis* I.N.H.-résistant. a) cristaux géants plus ou moins quadrangulaires à côté de cristaux tétraédriques également géants, b) cristaux tétraédriques géants à délimitation irrégulière, c/d) cristaux tétraédriques géants composés, élargis dans un sens transversal et tronqués dans un sens vertical, e/f) formes cristallines superposables à celles de c/d. Le grossissement des cristaux géants peut être apprécié par rapport au diamètre des hématies non lysées.

Cobaye, il est connu que E. Roubaud (22) a rencontré, en 1906, des cristaux tétraédriques dans le sang du Cobaye ingéré par *Glossina palpalis*.

Les mêmes cristaux ont été décrits en 1907 par F. Stuhlmann (23) dans le sang du Cobaye ingéré par *Glossina fusca* et *Gl. tachinoides* et, en 1926, par G. Amantea (1) dans le sang du Cobaye ingéré par *Ixodes ricinus*.

Tous ces cristaux tétraédriques ont été décrits comme tels et Amantea a même énoncé l'opinion que leurs formations régulières sont une preuve de la précision des techniques physico-chimiques.

En présence de l'ensemble des données mentionnées, nous nous sommes proposé de rechercher s'il ne pouvait pas exister une sorte de plasticité de la molécule hémoglobinique, et, par conséquent, des cristaux élaborés, après le transvasement biologique du sang de Cobaye chez un Invertébré piqueur.

Pour effectuer ces tentatives de xénodiagnostic biologique, nous nous sommes adressés aux Réduvidés hématophages en faisant piquer le Cobaye par tous les stades évolutifs de *Triatoma megista*, *T. infestans*, *T. brasiliensis* et de *T. rubrovaria*.

Dans tous ces cas, nous avons pu constater que la cristallisation de l'hémoglobine du Cobaye se déroule sous la forme tétraédrique (fig. 1).

A côté des cristaux tétraédriques complets, la cristallisation biologique fournit aussi quelques cristaux tronqués.

Au cours de la cristallisation continue entre lame et lamelle, que nous désignons sous le nom de cristallisation biologique indirecte ou, dans le cas des Réduvidés, de cristallisation post-réduvidique, on peut constater une croissance des formes tétraédriques préformées et l'élaboration de nouveaux cristaux tétraédriques, l'apparition d'autres formes cristallographiques faisant défaut.

Pour prouver la spécificité de la cristallisation de l'hémoglobine sanguine du genre *Cavia*, nous avons mis en expérience des spécimens adultes de *Cavia aperea* (*Cavia pamparum*) qui sont des animaux de la taille d'un grand Lapin.

Les cristaux de leur hémoglobine sanguine, mis en évidence par la technique de xénodiagnostic biologique par l'intermédiaire des Réduvidés hématophages, ont été, en effet, également tétraédriques (fig. 2).

La cristallisation post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine de *Cavia aperea* ne fournit pas non plus d'autres cristaux que ceux de forme tétraédrique.

Après ces constatations portant sur la régularité et la spécificité des cristallisations biologiques de l'hémoglobine sanguine du Cobaye, nous avons procédé à une autre série d'expériences portant sur l'intoxication chronique du Cobaye par le tétrachlorure de carbone (17).

Dans ces conditions, la phase biologique directe ayant lieu au niveau de l'estomac des Réduvidés hématophages, a révélé d'abord une lyse accentuée des hématies et par la suite une élaboration massive des cristaux tétraédriques de l'hémoglobine sanguine du sang de Cobaye.

Ce n'est que pendant la phase de cristallisation biologique indirecte, entre lame et lamelle, que nous avons pu assister à l'élaboration de formes cristallographiques atypiques (fig. 3) qui, dans la perspective perpendiculaire, ont donné l'aspect d'hexagones.

Ces cristaux géants d'aspect hexagonal se sont trouvés parmi des cristaux toujours de forme tétraédrique.

A un plus fort grossissement, on peut reconnaître que ces cristaux géants présentent un aspect morphologique nouveau des cristaux de l'hémoglobine sanguine du Cobaye (fig. 4).

Un autre aspect morphologique des cristaux d'hémoglobine que nous avons pu observer au cours de la phase biologique indirecte a été l'effet de l'arborisation qui laisse reconnaître la répétition serrée des trames cristallographiques spécifiques sur un axe longitudinal commun (fig. 5).

Après une semaine environ, les préparations laissent apparaître l'élaboration d'autres cristaux géants d'hémoglobine qui sont d'une très grande rigidité montrant, bien que d'une manière imparfaite, leur dérivation de la trame tétraédrique des cristaux d'hémoglobine élaborés par voie biologique (fig. 6).

Une semaine plus tard, nous avons assisté à la décoloration progressive de ces cristaux géants (fig. 6). Cette séparation de l'hème de la globine ne pouvait être obtenue jusqu'alors que par des procédés physico-chimiques très complexes.

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié, en collaboration avec J. J. Estable et A. Puppo (18), la répercussion éventuelle de l'intoxication chronique du Cobaye par la phénylhydrazine, sur les cristallisations biologiques de l'hémoglobine sanguine de ces animaux, ingérée par des Réduvidés hématophages.

A cette fin, les Cobayes, mis en expérience, ont reçu pendant une période de six semaines, deux fois par semaine, 0,01 g de chlorhydrate de phénylhydrazine par 100 g de poids, par voie intramusculaire.

L'effet de cette intoxication a été l'apparition de cristaux d'hémoglobine sanguine géants, de délimitation irrégulière ou incomplète, à côté des cristaux tétraédriques normaux (fig. 7 et 8).

Ces cristaux géants étaient très denses et pour cette raison presque opaques, et, à côté d'eux, nous avons rencontré aussi d'autres formes géantes dont tous les angles étaient tronqués.

D'autres produits cristallins géants se présentent au cours de la phase réduvidique sous forme de corps arrondis (fig. 9 et 10).

Il nous a été impossible de déterminer la genèse de ces dernières formes. Il est possible que ces formes cristallines arrondies présentent des cristaux initialement réguliers mais gonflés. Le gonflement des cristaux d'hémoglobine élaborés par des méthodes physico-chimiques est bien connu. Une autre interprétation serait qu'il s'agit au contraire d'une étape de lyse des cristaux de délimitations régulières et, enfin, il y a une troisième possibilité, que nous tenons pour la plus vraisemblable, à savoir qu'il s'agit d'une cristallisation avortée. En outre, les formes cristallines bien arrondies et transparentes (fig. 10) nous rappellent l'ingénieuse méthode de la projection sphérique des faces d'un cristal. En plus, il nous paraît que la réalité des formes cristallines arrondies traduit la délimitation sphérique du champ des forces de cristallisation de nos cristaux autrement tétraédriques. Nous reviendrons ultérieurement d'une manière plus approfondie sur cette question.

Les formes cristallines arrondies de l'hémoglobine sanguine du Cobaye sont l'expression d'une perturbation profonde de son pouvoir de cristallisation ne fournissant normalement que des forces tétraédriques bien délimitées.

Au cours de la phase de la cristallisation biologique indirecte se produisant entre lame et lamelle, d'autres formes apparaissent, à savoir des cristaux d'hémoglobine géants, incomplets et transparents (fig. 11), ainsi que des cristaux d'hémoglobine extrêmement minces (fig. 12), dont la présence peut être mise en évidence par la lumière polarisée.

Enfin, en collaboration avec le Professeur J. B. Bretey, chef du Service du B.C.G. à l'Institut Pasteur de Paris, nous avons examiné la répercussion de l'infection du Cobaye par le *Mycobacterium tuberculosis* INH-résistant sur la cristallisation biologique directe et indirecte de l'hémoglobine de ces animaux.

Dans ce cas aussi, cette répercussion a été profonde faisant apparaître, à côté des cristaux tétraédriques normaux, des cristaux géants d'hémoglobine parmi lesquels ont dominé les formes élargies dans un sens transversal et tronquées dans un sens vertical (fig. 13).

Partant de la technique du xénodiagnostic par E. Brumpt (4), nous avons pu démontrer que le principe de cette technique est également utilisable sur le plan biologique, pathologique et pharmacodynamique révélant des différences appréciables dans les cristallisations réduvidiques et post-réduvidiques de l'hémoglobine sanguine des Cobayes mis en expériences.

En opposition avec cette technique de transvasement direct du sang circulant d'un donneur au receveur qui procède, par des moyens biologiques, à la cristallisation de l'hémoglobine sanguine, il n'y a rien d'étonnant qu'aucun procédé physico-chimique ne puisse en faire autant.

En Résumé

Nous avons pu démontrer que :

1° l'hémoglobine sanguine du Cobaye, ingérée par des Réduvidés hématophages, cristallise spontanément au niveau de l'estomac de ces Arthropodes, sous forme tétraédrique ;

2° cette cristallisation continue, entre lame et lamelle, ne fournit pas d'autres formes cristallines que celles de tétraèdres réguliers ;

3° le sang de *Cavia aperea*, cristallisé par voie biologique, donne également des formes cristallines tétraédriques, bien que plus transparentes que celles de *Cavia cobaya*, prouvant ainsi la spécificité de la réaction ;

4° l'intoxication chronique par le tétrachlorure de carbone, par le chlorhydrate de phénylhydrazine ou l'infection du Cobaye par un *Mycobacterium tuberculosis* INH-résistant, répercutent d'une manière appréciable et différenciée sur la morphologie des cristaux de l'hémoglobine sanguine du Cobaye, réactions qui feront les sujets de recherches ultérieures.

Bibliographie

1. AMANTEA (G.), 1926. — Sulla cristallizzazione dell'emoglobina nell'intestino di alcuni ematofági. *Boll. Soc. Bio. sper.*, I, 66-69.
2. ARTHUS (M.), 1895. — Procédé permettant d'obtenir facilement et rapidement des cristaux d'oxyhémoglobine. *C.R. Soc. Biol.*, XLVII, 686.
3. BOOR (A. K.), 1930. — A crystallographic study of pure carbonmonoxide hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, XIII, 307-316.
4. BRUMPT (E.), 1914. — Le xénodiagnostic. *Bull. Soc. Path. exot.*, VII, 706-710.
5. BUCHELER (M.), 1883. — *Beiträge Zur Kenntnis des Pferdeblutfarbstoffes*. Diss. Tübingen, 30 pp.
6. CANNAN (R. K.) et REDISH (J.), 1942. — in: *S. Mudd et W. Thalhimer: Blood substitutes and blood transfusion*.
7. DRABKIN (D. L.), 1946. — The crystallographic and optic properties of the haemoglobin of Man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.*, CLXIV, 703-723.
8. FUNKE (O.), 1852. — Ueber Blutkrystallisation. *J. prakt. Chem.*, LVI, 193-196.
9. HEIDELBERGER (M.), 1922. — Method for the preparation of crystalline oxyhemoglobine. *J. Biol. Chem.*, LIII, 31-40.
10. HOPPE-SEYLER, 1867. — Beiträge zur Kenntniss des Blutes des Menschen un der Wirbelthiere. *Med. Chem. Untersuchungen*, II, 169-208.
11. HÜFNER (G.), 1887. — Beitrag zur Lehre vom Blutfabstoffe. *Beitrag z. Physiologie*: 70. Geb. Tag Carl Ludwig, Leipzig, 74-81.
12. KUNDE (F.), 1852. — Ueber Krystallbildung im Blute. *Ztchr. rat. Med.*, II, 271-284.
13. LANG (V. von), 1863. — Krystallographische u. optische Mittheilungen über die Blutkrystalle. *Sitzber. Math.-Naturwiss. Cl., Kaiserl. Akad. Wiss.*, Wien., XLVI, 84-98.
14. LEHMANN, 1852. — Ueber die Krystallisirbarkeit eines der Hauptbestandtheile der Blutkörperchen. *Ber. Verhdln. Königl. sächs. Ges. Wiss., Math.-Phys.*, Cl. 23-26.
15. LEHMANN, 1852. — Ueber den krystallisirbaren Stoff des Blutes. *Ber. Verhdln. Königl. sächs. Ges. Wiss. Math.-Phys.*, Cl., 78-84.
16. LEHMANN (C. G.), 1853. — Weitere Mittheilungen über die krystallisirbare Proteinsubstanz des Blutes. *Ber. Verhdln. Königl. sächs. Ges. Wiss. Math.-Phys.*, Cl. 101-133.
17. PICK (F.), 1953. — Repercusion de la intoxicacion cronica por el tetracoloruro de carbono sobre las cristalizaciones reduvidicas de la hemoglobina del Cobayo. *Arch. Soc. Biol.*, Montevideo, XX, 183-187.
18. PICK (F.), ESTABLE (J. J.) et PUPPO (A.), 1955. — Repercusion de la intoxicacion cronica por fenilhidrazina sobre las cristalizaciones reduvidicas de la hemoglobina del Cobayo. *Soc. Biol.*, Montevideo, Session du 26 mai.
19. REICHERT (K. E.), 1849. — Beobachtungen über eine eiweissartige substanz in Krystallform. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, 197-251.
20. REICHERT (K. B.), 1852. — Berichte über die Fortschritte der mikroskopischen Anatomie im Jahre 1851. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, 68-125.
21. ROLLET (A.), 1863. — Versuche und Beobachtungen am Blute. *Sitzber. Math.-Naturw. Cl. Kaiserl. Akad. Wiss.*, Wien., XLVI, 65-83.
22. ROUBAUD (E.), 1955. — Communication personnelle.
23. STUHLMANN (F.), 1907. — Beiträge zur Kenntnis der Testsefliege. *Arb. Kaiserl. Ges.-Amt.*, XXVI, 301-383.