Sur les cristallisations réduvidique et post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine du Chien et quelques expériences cristallographiques comparatives

Par F. PICK

Bien que le sang du Chien n'ait pas été trop souvent mis en expérience en ce qui concerne la cristallisation de son hémoglobine, nous jugeons nécessaire de donner un aperçu historique de cette question.

D'après notre avis, c'était H. L. Zwicky (21) qui, en 1845, a été le premier en présence des cristaux d'hémoglobine canine, rétrospectivement faciles à identifier. Ces cristaux ont toujours été pris comme dérivés de l'hématoïdine.

La première préparation des cristaux d'hémoglobine du sang de Chien « in vitro » a été réalisée en 1851 par O. Funke (6) qui a mélangé ce sang avec l'éther.

F. Kunde (9) a signalé, en 1852, avoir obtenu des cristaux merveilleux du Chien en additionnant ce sang d'eau gommée.

En 1853, C. G. Lehmann (11) a essayé la première tentative d'identifier les cristaux du sang de Chien en les déterminant comme des cristaux prismatiques.

La première observation de la cristallisation spontanée de l'hémoglobine canine a été faite en 1863 par Pasteur (12), que nous présentons à titre historique :

« Dans les circonstances dont je viens de parler, où le sang exposé au contact de l'air pur ne se putrifie pas du tout, les cristaux du sang se forment avec une remarquable facilité. Dès les premiers jours de son exposition à l'étuve, plus lentement à la température ordinaire, le sérum se colore peu à peu en brun foncé. Au fur et à mesure que cet effet se produit, les globules du sang disparaissent, et le sérum et le caillot se remplissent de cristaux aiguillés très nets, teints en brun ou en rouge. Au bout de quelques semaines, il ne reste pas un seul globule sanguin ni dans le sérum ni dans le caillot. Chaque goutte de sérum renferme par milliers les cristaux et, la plus petite parcelle de caillot, écrasé sous la lame de verre, offre de la fibrine incolore, très élastique, associée à des amas de cristaux en nombre incalculable, sans que l'on puisse nulle part découvrir la moindre trace des globules du sang.

M. Claude Bernard a eu l'extrême obligeance de présider lui-même à la prise du sang. »

Nous retenons que Pasteur (14) n'a même pas effleuré la question de l'appartenance éventuelle des cristaux, observés par lui-même, à un des systèmes de la cristallographie minéralogique, bien que ces essais aient été déjà à l'ordre du jour.

A peu près en même temps, Justus de Liebig a donné son cours de cristallographie dont certains propos ont été conservés par G. F. Knapp (8) :

« Le Maître a enseigné la cristallisation. On a été enchanté quand il a dépeint que la nature inorganique aime la ligne droite, mais que la nature organique procède à son incurvation. »

Liebig a bien été au courant des recherches portant sur la cristallisation de l'hémoglobine, car J. Budge (4) a communiqué avoir démontré, en 1851, des cristaux d'hémoglobine élaborés par des sangsues, à Liebig.

Egalement, en 1863, A. Rollet (18), en congelant et dégelant le sang du Chien, est arrivé à faire cristalliser l'hémoglobine canine.

Ces cristaux, ayant la forme de longues aiguilles ou de prismes droits à bases planes, montrant de la bi-réfringence et du dichroïsme, appartiendraient, d'après V. de Lang (10), au système rhombique.

Pour faire cristalliser l'hémoglobine canine entre lame et lamelle, E. T. Reichert et A. P. Brown (16) ont utilisé le sang du Chien défibriné ou oxalaté, laqué par l'éther et centrifugé. Les cristaux d'hémoglobine obtenus appartiendraient, d'après ces auteurs, à deux systèmes cristallographiques différents, se présentant sous forme de l'alpha-oxyhémoglobine orthorhombique et de la bêta-oxyhémoglobine monoclinique.

P. Richet (17) a observé des cristaux de l'oxyhémoglobine du Chien, sous forme de prismes terminés par des pyramides.

En 1926, H. Goffart (7) a obtenu des cristaux d'hémoglobine canine par un procédé combiné auquel nous ajoutons les sources bibliographiques : le sang est additionné d'oxalate d'ammonium, d'après E. T. Reichert, 1903 (15), exposé au gel et au dégel, d'après A. Rollet, 1863 (18) et mélangé au baume de Canada, d'après S. de Stein, 1884 (19). Goffart (7) a reproduit des dessins montrant des prismes triangulaires, quadrangulaires et hexagonaux, terminés par des faces planes ainsi que des plaques losangiques.

Dans la même année, G. Amantea (1) a réussi à obtenir des cristaux d'hémoglobine canine par la technique de saponine, d'après G. Amantea et C. Krzyzskowsky (2), prismatiques ou en forme d'aiguilles.

G. Amantea (1) a, en outre, observé que le sang du Chien cristallise au niveau du trajet intestinal d'*Ixodes ricinus*, sous forme de grands prismes ou de petits prismes rectangulaires ou losangiques.

L'interprétation des cristaux d'hémoglobine losangiques formés dans le trajet intestinal de l'*Ixodes*, qui ne sont pas à mettre en évidence par la technique de la saponine, a été laissée par Amantea en suspens.

FIG. 1. — Cristallisation de l'hémoglobine sanguine du Chien par le sulfate d'ammonium, montrant des formes prismatiques, terminées dans la perspective perpendiculaire par des triangles et des cristaux en forme d'aiguilles. Le diamètre transversal commun de la base de trois cristaux prismatiques sortant à gauche en bas est de 1 mm.

En 1930, A. K. Boor (3) a utilisé une autre technique combinée de préparation des cristaux de l'hémoglobine : Séparation des globules rouges par centrifugation, lavage par une solution saline, laquage par de l'eau, mélange à la crème d'aluminium, filtration à basse température, lavage du précipité par décantation. Préparation éventuelle des cristaux de carboxyhémoglobine.

A l'aide de cette technique, A. K. Boor (3) a pensé avoir obtenu, comme E. T. Reichert et A. P. Brown (16), des cristaux orthorhombiques d'alpha-oxyhémoglobine et des

FIG. 2. — Cristallisation biologique directe de l'hémoglobine sanguine du Chien au niveau du trajet intestinal de *Rhipicephalus sanguineus*. Formation des cristaux prismatiques trappus aux arêtes centrales.

L'extension longitudinale du cristal de gauche est de 40 μ .

FIG. 3. — Cristallisation biologique indirecte de l'hémoglobine sanguine du Chien, ayant été ingérée par *R. sanguineus*, entre lame et lamelle. La plus grande extension longitudinale du cristal incomplet en bas est de 55 μ .

FIG. 4. — Cristallisation réductive de l'hémoglobine sanguine du Chien montrant des formes prismatiques parfois géantes, toutes très friables. L'extension longitudinale du plus grand cristal se trouvant dans la moitié droite du document est de 130 μ .

cristaux de bêta-oxyhémoglobine, ainsi que des cristaux de carboxyhémoglobine de type prismatique unique appartenant au système orthorhombique.

En 1946, D. L. Drabkin (5) a constaté que l'hémoglobine du sang de Chien cris-

FIG. 5. — Cristallisation post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine du Chien, montrant des formes en bâtons rectilignes terminées par des faces planes ou obliques et des petits cristaux très denses, parfois rectangulaires. Le cristal rectangulaire, se trouvant à peu près au milieu du document, a une extension transversale de 35 μ .

FIG. 6. — Cristallisation post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine du Chien atteint de la Maladie de Carré. L'extension longitudinale du plus grand cristal du document est de 250 μ .

tallise spontanément en présence ou en absence de sulfate d'ammonium ou d'autres sels, proposant de prendre ce processus comme type de cristallisation spontanée. « Spontaneously (in reference to crystallization) is used in a broad sens to describe the crystallization which practically allways occurs with dog hemoglobin. ».

En présence des travaux portant sur la cristallisation de l'hémoglobine canine effectués parfois par de grands moyens de dénaturation, nous avons procédé dans un premier temps à la cristallisation de cette hémoglobine en utilisant l'héparine, l'eau distillée et le sulfate d'ammonium.

Nous avons ainsi obtenu des cristaux prismatiques, terminés dans la perspective perpendiculaire, d'une manière triangulaire et en forme d'aiguilles (fig. 1).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposé de nous approcher des conditions d'expériences d'Amantea (1), en faisant exploiter des Chiens par *Rhipicephalus sanguineus* (13).

Le sang du Chien, ayant été ingéré par *R. sanguineus*, nous a révélé la présence

de cristaux prismatiques trappus à arête centrale saillante, élaborés par voie biologique directe (fig. 2).

Au cours de la continuation de la cristallisation biologique, entre lame et lamelle, nous avons pu constater que les formes plus ou moins quadrangulaires aux arêtes saillantes cessent leur croissance et sont lysées tandis que d'autres cristaux d'hémoglobine allongés et d'aspect prismatique, souvent incomplets, font leur apparition (fig. 3).

Au cours de la phase biologique indirecte, se déroulant entre lame et lamelle, nous avons rencontré parfois des cristaux d'hémoglobine d'aspect losangique dont *Amantea* (1) a mentionné l'élaboration chez *Ixodes ricinus*.

Dans un troisième temps, nous nous sommes adressés aux différentes espèces de Réduvidés hématophages pour étudier la question des cristallisations biologiques de l'hémoglobine canine.

C'est ainsi que nous avons pu constater qu'au cours de la phase biologique directe (cristallisation réduvidique) sont exclusivement élaborés des cristaux prismatiques à faces terminales plus ou moins planes, parfois géants, mais tous très friables (fig. 4).

La cristallisation post-réduvidique (fig. 5) correspondant à la continuation de la cristallisation biologique, entre lame et lamelle, montre la disparition complète des formes prismatiques de la phase réduvidique et l'élaboration des cristaux d'hémoglobine sous forme de bâtons rectilignes terminés par des faces planes ou obliques. Il y a, en outre, l'apparition des petits cristaux d'hémoglobine très denses, de couleur rouge foncé et parfois quadrangulaires.

Toutes ces cristallisations biologiques uniformes des Réduvidés hématophages ont en commun qu'elles ne fournissent pas des cristaux losangiques observés par *Amantea* chez *Ixodes ricinus* et par nous chez *Rhipicephalus sanguineus*.

Nous avons enfin recherché une répercussion éventuelle de la Maladie de Carré sur les cristallisations réduvidique et post-réduvidique de l'hémoglobine sanguine des Chiens infectés.

En collaboration avec T. Pereira Fonseca, nous avons pu constater (14) que, dans ces cas, la cristallisation biologique directe de l'hémoglobine sanguine des Chiens malades est sensiblement retardée, fournissant enfin d'innombrables cristaux fins et aiguillés.

Au cours de la phase post-réduvidique, nous avons pu assister à l'élaboration de très longs cristaux prismatiques bien transparents (fig. 6).

De l'ensemble de travaux mentionnés ressort que les différentes voies physico-chimiques pour arriver à une cristallisation de l'hémoglobine sanguine du Chien ne donnent pas des réponses entièrement superposables, un fait qui a été déjà enregistré en 1853 par L. Teichmann (20), qui s'est exprimé d'une manière encore plus précise : « Nicht einmal die aus dem Blute eines und desselben Gefäßes eines Hundes entstehenden Krystalle haben gleiche Form, wenn man sie auf verschiedene Weise darstellt. »

Mais aussi sur le plan des cristallisations biologiques, d'une part, chez des Ixodidés et, d'autre part, chez des Réduvidés existent des différences appréciables.

Pour cette dernière raison, nous nous sommes décidés de ne mettre en expérience que des Réduvidés hématophages qui donnent des réponses cristallographiques unifor-

mes, pour effectuer nos recherches portant sur le xénodiagnostic biologique et des états pathologiques d'un donneur.

En Résumé

Nous avons pu démontrer que :

1° les cristallisations biologiques directes et indirectes de l'hémoglobine sanguine canine par *Rhipicephalus sanguineus* sont différentes de la cristallisation de la même hémoglobine observée par G. Amantea chez *Ixodes ricinus*, en ce qui concerne la morphologie des cristaux d'hémoglobine élaborés, mais que ces deux réactions ont en commun l'apparition des cristaux d'hémoglobine losangiques ;

2° les cristallisations biologiques directes et indirectes de l'hémoglobine sanguine canine par des Réduvidés hématophages en général fournissent toujours les mêmes formes, ce qui rend recommandable de les utiliser pour des expériences sur le plan du xénodiagnostic du contrôle de l'équilibre biologique et des états pathologiques du donneur ;

3° la Maladie de Carré se répercute d'une manière appréciable sur les cristallisations réduvidiques et post-réduvidiques de l'hémoglobine sanguine des Chiens malades.

Bibliographie

1. AMANTEA (G.), 1926. — Sulla cristallizzazione dell'emoglobina nell'intestino di alcuni ematofagi. *Boll. Soc. Biol. sperim.*, I, 66-69.
2. AMANTEA (G.) et KRZYSZKOWSKY (C.), 1920. — Sulla cristallizzazione dell'emoglobina. *Arch. Fisiologia*, XVIII, 87-92.
3. BOOR (A. K.), 1930. — A crystallographic study of pure carbonmonoxide hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, XIII, 307-316.
4. BUDGE (J.), 1862. — Lehrb. spez. Physiol. Mensch., xxxv + 1.004 pp.
5. DRABKIN (D. L.), 1946. — The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of Man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.*, CLXIV, 703-723.
6. FUNKE (O.), 1851. — Ueber das Milzvenenblut. *Ztschr. rat. Med.*, I, 172-218.
7. GOFFART (H.), 1926. — Beitrag zur Kenntnis der Oxyhämoglobinkristalle placentaler Säugetiere. *Zool. Jahrb. Allg. Zool. Physiol.*, XLII, 193-242.
8. KNAPP (G. F.), 1903. — Zur hundertsten Wiederkehr von Liebig's Geburtstag. *Ber. D. Chem. Ges.*, XXXVI, p. 1323.
9. KUNDE (F.), 1852. — Ueber Krystallbildung im Blute. *Ztschr. rat. Med.*, II, 271-287.
10. LANG (V. von), 1863. — Krystallographische und optische Mitteilungen über die Blutkrystalle. *Sitzber. Math.-Naturwiss. Cl. Kaiserl. Akad. Wiss.*, XLVI, 84-98.
11. LEHMANN (C. G.), 1853. — Weitere Mitteilungen über die krystallisierbare Proteinsubstanz des Blutes. *Verhdlgn. Königl. sächs. Ges. Wiss. Math.-Phys. Cl.*, 101-133.

12. PASTEUR (L.), 1863. — Examen du rôle attribué au gaz oxygène atmosphérique dans la destruction des matières animales et végétales après la mort. *C.R. Ac. Sci.*, LVI, 734-740.
 13. PICK (F.), 1954. — Sobre la cristalización de la sangre ingerida por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1804). *Arch. Soc. Biol. Montevideo*. XXI, 159-164.
 14. PICK (F.) et PEREIRA FONSECA (T.), 1955. — Las cristalizaciones reduvidicas de la hemoglobina de perros atacados por la enfermedad de Joven Edad encontrado en el Uruguay. *Soc. Biol. Montevideo*, Séance du 26 mai.
 15. REICHERT (E. T.), 1903. — Quick methods for crystallizing oxyhaemoglobin: Inhibitory and accelerator phenomen, etc.: changes in the form of crystallization. *Amer. J. Physiol.*, IX, 97-99.
 16. REICHERT (E. T.) et BROWN (A. P.), 1909. — *The crystallography of hemoglobin*. Carnegie Inst. Washington, Publ. n° 116. XIX + 338 pp. 100 tables = 600 microphotos.
 17. RICHET (Ch.), 1909. — *Dictionnaire de Physiologie*, VIII, 321 suiv.
 18. ROLLET (A.), 1863. — Versuche und Beobachtungen am Blute. Sitzber. Math.-Naturwiss. Cl. Kaiserl. Akad. Wiss., XLVI, 65-83.
 19. STEIN (S. von), 1884. — Eine neue Methode Hämoblobinkristalle zu erhalten. *Cb. med. Wiss.*, XXII, 404-405.
 20. TEICHMANN (L.), 1854. — Ueber die Krystallisation der organischen Bestandtheile des Blutes. *Ztschr. rat. Med.*, III, 375-388.
 21. ZWICKY (H.), 1845. — Die Metamorphose des Thrombus mikroskopisch untersucht. *Gekrönte Preisschrift*, Zürich, VIII + 78 pp.
-