Détermination Au Moyen du Sulfate de Soude du Nombre Relatif de Globules Rouges de Résistance Différente (Courbe de Résistance Osmotique): Influence du Régime Alimentaire Sur La Résistance Et La Régénération En Cas D'Anémie Posthémorragique

H.-J. Hamburger

To cite this article: H.-J. Hamburger (1921) Détermination Au Moyen du Sulfate de Soude du Nombre Relatif de Globules Rouges de Résistance Différente (Courbe de Résistance Osmotique): Influence du Régime Alimentaire Sur La Résistance Et La Régénération En Cas D'Anémie Posthémorragique, Archives Internationales de Physiologie, 18:1, 643-667, DOI: [10.3109/13813452109144213](https://doi.org/10.3109/13813452109144213)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/13813452109144213>

Published online: 26 Sep 2008.

Submit your article to this journal [↗](#)

View related articles [↗](#)

**DÉTERMINATION AU MOYEN DU SULFATE DE SOUDE
DU NOMBRE RELATIF DE GLOBULES ROUGES
DE RÉSISTANCE DIFFÉRENTE
(COURBE DE RÉSISTANCE OSMOTIQUE)**

*Influence du régime alimentaire sur la résistance
et la régénération en cas d'anémie posthémorragique.*

par

H.-J. HAMBURGER

(Laboratoire de physiologie de l'Université de Groningen).

(6 figures)

INTRODUCTION

EN 1883, on découvrit que l'hémolyse est dépendante de la pression osmotique des liquides avec lesquels les hématies sont mises en contact ⁽¹⁾.

Mettons, par exemple, dans 3 cc. de NaCl à 0.51 %, 0.06 cc de sang humain ; mélangeons, abandonnons le mélange pendant une demi-heure et centrifugeons ensuite : le liquide surnageant sera incolore.

Si l'on fait la même expérience avec une solution de NaCl un peu plus faible, une solution de 0.50 %, par exemple, le liquide surnageant sera rougeâtre, une petite partie des globules sanguins ayant perdu des matériaux colorants. Les globules hémolysés sont précisément les globules les moins résistants vis-à-vis de la solution de NaCl à 0.50 %.

C'est habituellement par cette concentration que l'on désigne la résistance vis-à-vis d'une solution hypotonique de NaCl.

Il est évident que plus la solution est faible, plus les globules sont hémolysés. Finalement, nous pouvons trouver une solution au

(1) HAMBURGER. Procès-verbal de la Koninkl. Akad. v. Wetensch. à Amsterdam. Séance du 29 décembre 1883 ; 26 mars 1885. Une traduction allemande de la première communication se trouve dans *Festschrift d. Biochem. Zeitschrift H. J. Hamburger gewidmet*. Berlin, Julius Springer, 1908.

contact de laquelle plus un seul globule ne conservera sa matière colorante.

Pour l'homme, cette solution se rapproche d'une moyenne de 0.36 % de NaCl : elle correspond à la résistance-maxima, en opposition avec la première solution, de 0.50 %, qui indique la résistance minima.

Grâce à la grande sensibilité et l'exécution facile de la méthode, la détermination de la solution saline qui cause un début d'hémolyse a trouvé beaucoup d'applications, non seulement en physiologie mais aussi en clinique.

VAN LIMBECK ⁽¹⁾ fut le premier clinicien qui rechercha, dans différentes maladies, la résistance minima, c'est-à-dire la solution de NaCl qui provoque un début d'hémolyse. Après lui, beaucoup d'autres cliniciens, surtout des Français, s'occupèrent de cette question. Malheureusement les succès n'ont pas encore pleinement couronné les efforts dépensés au cours de ces recherches ⁽²⁾.

Je ne m'étendrai pas sur les causes de cette déception, qui provient surtout du fait que les différents expérimentateurs ont adopté des méthodes de travail différentes, de sorte que les résultats auxquels ils aboutirent ne peuvent être comparés. J'ai exprimé cette opinion jadis, dans mon rapport au *Congrès médical international de Paris 1910*, ainsi que dans un article du *Journal de Physiologie normale et pathologique* ⁽³⁾. Au cours de ces dernières années, différents auteurs se sont ralliés à mon opinion, quant au besoin d'unité dans la technique ; plusieurs, E. MAY, RIBIERRE, SOMMER, etc., ont même recommandé la méthode que je préconisais. Mais nous n'en sommes pas arrivés là :

⁽¹⁾ VAN LIMBECK, *Prager Med. Wochenschr.*, 1898, n° 28, et. 29.

⁽²⁾ Il est fait uniquement allusion ici aux recherches faites en clinique et qui eurent pour but de rechercher dans quelle mesure les différentes maladies avaient une influence sur la résistance minima. La remarque ne se rapporte donc pas à la valeur pour les cas où l'on démontra avec succès, pour un même sang, l'influence de différents facteurs sur l'hémolyse. C'est ainsi qu'au moyen de l'hémolyse le pouvoir osmotique du sérum fut démontré pour la première fois. C'est aussi grâce à l'hémolyse que l'influence du CO₂, des acides, des bases, furent étudiées ; de même ce fut au moyen d'elle que l'on étudia pour la première fois la résorption dans les cavités sereuses. D'autre part, beaucoup d'autres recherches se firent par la physico-chimie sans le secours de la théorie des pressions osmotiques. (Consulter mon article : *Isotonie* dans le Dictionnaire de Physiologie de CHARLES RICHTER. De plus, voir : 25 années de pression osmotique dans les sciences médicales, dans JANUS 1912 ; *Zur Geschichte und Entwicklung der physikalisch-chemischen Forschung in der Biologie in Internationale Zeitschr. f. physikalisch-chemische Biologie*, I, 1 (1914).

⁽³⁾ *Journal de Physiologie normale et pathologique*, 1900

aussi CHAUFFART et RENDU ⁽¹⁾ indiquent, chez l'individu normal, comme résistance minima, une solution de NaCl de 0.41 % à 0.38 %, tandis que MAY ⁽²⁾ trouve, pour la même valeur, 0.48 % à 0.46 %. Néanmoins il est d'usage de poser un diagnostic pour des différences de 0.06 % à 0.1 % ! Je tiens à le répéter : pour que la détermination de la résistance ait une signification pratique en clinique il faut qu'il y ait de l'unité dans la méthode.

Au cours de ces toutes dernières années, l'on a encore utilisé d'une autre manière l'hémolyse par des solutions hypotoniques, cette fois non seulement pour la recherche de la résistance minima et maxima mais aussi pour rechercher les globules à résistance intermédiaire. On a notamment recherché le nombre relatif de globules de résistance différente qui se trouvent dans le sang d'un individu et cela dans diverses circonstances physiologiques et pathologiques.

Ces recherches furent faites pour la première fois en 1912 par SNAPPER ⁽³⁾, dans mon laboratoire, et non par MAY, comme nous aurions pu le croire d'après la dissertation très appréciée qu'il publia en 1914.

Ces recherches peuvent nous donner des renseignements multiples, entre autres sur la *destruction* et la *régénération* des globules rouges chez l'individu sain ainsi que chez les malades, etc.

Les principaux résultats acquis dans ce domaine, tant par nous-mêmes que par d'autres dans notre laboratoire, se groupent en deux catégories de faits :

1^o Les globules jeunes néo-formés ont, vis-à-vis de solutions hypotoniques de NaCl, une résistance plus grande que les vieux globules (HAMBURGER et UBBELS ⁽⁴⁾, SNAPPER ⁽⁵⁾, BRINKMAN et Mademoiselle VAN DAM ⁽⁶⁾) ; de cette façon, la mesure de la régénération

(1) CHAUFFART et RENDU. *Presse médicale*, 1907, n° 5.

(2) E. MAY. Thèse. Paris, 1914.

(3) SNAPPER. *Biochemische. Zeitschrift.*, 256, 1912. Aussi dans le compte rendu de la *Koninklijke Akad. v. Wetensch. Amsterdam*. Séance du 29 juin 1912. Il en existe aussi une traduction anglaise.

(4) HAMBURGER et UBBELS. *Mutterliches und fötales blut. Osmotischer Druck. u. Ionenlehre*, Bd II, 186, 1904.

(5) SNAPPER. *Vergleichende Untersuchungen über junge und alte rote Blutkörperchen. Biochem. Zeitschrift.*, XLIII, 256, 1912 ; XLIII, 266, 1912. Voyez aussi SNAPPER, l. c.

(6) BRINKMAN et M^{lle} VAN DAM. *Studien zur Biochem. der Phosphatide und Sterine. Biochem. Zeitschrift.*, CVIII, pp. 35 et 61, 1920. Voyez aussi : *Proceedings. Kon. Akad. v. Wetenschappen*, te Amsterdam, 1920.

nous sera donnée par l'augmentation relative du nombre des globules très résistants, c'est-à-dire des jeunes globules.

2° Un second fait fut surtout mis en évidence par BRINKMAN : les globules absorbent des lipoïdes, notamment de la lécithine, qui leur viennent du plasma ; cette dernière peut être enlevée des globules par lavage au moyen d'une solution saline, mais elle peut aussi leur être rendue après ce lavage, à condition de mettre les globules en contact avec du sérum ou un autre liquide contenant de la lécithine. Or, la lécithine paraît posséder la propriété d'abaisser la résistance des globules rouges.

Donc ces derniers, après qu'ils ont été lavés au NaCl, ont une résistance plus grande que les globules très jeunes, à peine sortis de la moelle osseuse et qui n'ont pas encore été dotés d'une couche de plasma.

Il paraît manifeste que les globules rouges doivent posséder une résistance plus grande immédiatement après leur formation dans la moelle osseuse que quand ils ont eu le temps d'adsorber une petite couche de lipoïdes du plasma.

Comme nous le savons, les cliniciens donnent le nom *d'anémies primaires* à celles qui ont leur origine dans les maladies de la moelle osseuse, *d'anémies secondaires* à celles qui proviennent d'une action néfaste du plasma sanguin sur les globules rouges. Conformément à cette classification, nous pouvons appeler *courbe de résistance primaire* la courbe de résistance osmotique des globules qui sont lavés dans des solutions de NaCl, tandis que la courbe de la résistance des globules non lavés sera appelée *courbe de résistance secondaire* (II) ⁽¹⁾. Peut-être le lecteur objectera-t-il que dans les deux cas la résistance est recherchée au moyen de solutions salines et que par conséquent les globules qui ne sont pas débarrassés de leur plasma viennent quand même en contact de la solution aqueuse de sel. Mais n'oublions pas que l'hémolyse de ces globules a déjà eu lieu, par suite de l'hypotonie même, avant que la couche de lécithine ait été enlevée.

(¹) BRINKMAN et VAN DAM, l. c.

*Quelques remarques à propos de la méthode suivie
dans la détermination de la résistance ⁽¹⁾*

Prenons quelques tubes à réaction de grandeur égale, de préférence munis d'un bouchon en verre poli ; mettons y 3 cc. de solution saline de concentration décroissante ; puis faisons tomber dans chaque tube 0.08 cc. de gouttes de sang ; mélangeons, abandonnons le mélange de 15 à 30 minutes.; centrifugeons pendant 10 minutes. Nous constaterons alors que dans les premiers tubes le liquide surnageant est incolore, qu'il est rouge dans les tubes suivants. Dans les solutions les plus faibles, tous les globules rouges auront perdu leur matière colorante : il n'y aura plus d'hématies visibles au fond des tubes. C'est le moment de déterminer l'intensité de l'hémolyse dans les différents tubes.

Le principe de la méthode employée a été mis en avant par ARRHENIUS et MADSEN ⁽²⁾ : on compare le degré de coloration du liquide hémolysé avec celui d'une échelle de teintes rouges. Pour réaliser cette échelle, on verse dans un tube 0.08 cc. de sang dans 3 cc. d'eau : il se produit alors, dans ce tube, une hémolyse complète. Le degré d'hémolyse peut être représenté par le nombre 100. En diluant ce liquide au moyen d'une quantité égale d'eau, nous obtenons une solution qui nous donnera une hémolyse d'intensité 50 %. Pour ne citer qu'un exemple, disons que si la couleur rouge dans un des petits tubes à examiner est égale à la coloration rouge d'un liquide à hémolyse complète, la solution hypotonique de NaCl a hémolysé dans ce tube 100 % des globules rouges. De même, si la couleur du liquide obtenu par centrifugation correspond à la couleur du mélange eau-sang dilué d'eau à parties égales, la solution hypotonique de sel examinée aura hémolysé 50 % des erythrocytes. De cette manière, on peut facilement dire le pourcentage des globules du sang détruits par différentes solutions de NaCl, c'est-à-dire le nombre relatif des globules de résistance différente.

Envisageons maintenant une question des plus importantes :

⁽¹⁾ Ici, je serai aussi bref que possible : on peut trouver plus amples détails dans ABDERHALDEN, *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*. Un article ultérieur sera d'ailleurs consacré à ce sujet.

⁽²⁾ ARRHENIUS et MADSEN, *Zeitschr. f. physik Chemie*, 1903.

Au moyen de quelles solutions salines faut-il déterminer la résistance ?
 Au moyen de quelles solutions salines les globules doivent-ils être
 « déplasmatisés » en vue de la détermination de la résistance pri-
 maire ?

Liquide au moyen duquel les globules doivent être traités.

*(Solution pure de NaCl — oxalate de K — Solution saline équilibrée —
 ou sulfate de Na ?)*

On a considéré pendant longtemps la solution isotonique de NaCl
 comme le liquide physiologique par excellence.

En effet, comme je l'ai montré dès 1893 ⁽¹⁾, les globules rouges con-
 servent, dans cette solution isotonique, le même volume que celui qu'ils
 possèdent dans le sérum. Mais, déjà en 1889, j'avais prouvé ⁽²⁾ que dans
 une telle solution isotonique les globules ne conservent pas leur constitu-
 tion normale : il y a échange entre l'ion Cl monovalent du milieu ambiant
 et les ions bivalents ⁽³⁾, surtout du HPO_4 , du contenu. Pour chaque ion
 bivalent qui sort, 2 ions Cl doivent rentrer ; or, chaque ion, mono- ou
 bivalent, possède le même pouvoir osmotique. C'est pour cela que le con-
 tenu des globules traités par la solution isotonique de NaCl aura une pres-
 sion osmotique plus grande que le contenu normal ; ils abandonneront
 donc plus vite ses matières rouges. Ceci découle de la détermination du point
 de congélation des liquides qui justement ne provoquent pas encore d'hé-
 molyse.

Solution de NaCl	Δ	=	---	0.335°	
» » KNO_3	Δ	=	—	0.330°	
» » Na_2SO_4	Δ	=	—	0.287°	
Sucre de canne	Δ	=	-	0.280°	(2)

On voit que lorsque le milieu ambiant est une solution de NaCl ou de
 KNO_3 , la concentration de la solution qui fait équilibre au contenu des
 globules possède un pouvoir osmotique plus grand que lorsque l'on emploie
 du sucre de canne, substance pour laquelle il n'est pas question d'échange
 d'ions. Ce qui se constate pour le sucre de canne, s'observe également
 pour le Na_2SO_4 , parce que malgré l'échange d'anions le pouvoir osmotique
 du contenu des globules sanguins reste invariable. *De ce fait nous devrions
 déjà être amenés à considérer le Na_2SO_4 comme étant plus indifférent
 vis-à-vis du contenu des globules rouges que le NaCl.* Nous reviendrons

⁽¹⁾ HAMBURGER. *Centralblatt f. Physiologie*, 17 juin 1893.

⁽²⁾ HAMBURGER. *Z. f. Biol.*, 1889, 414 ; 1891, 405.

⁽³⁾ HAMBURGER. *Osmotischer Druck u. Ionenlehre*, Bd I, 237.

plus tard sur notre choix du Na_2SO_4 dans la détermination des résistances minima et maxima.

D'autres raisons plaident encore contre l'emploi du NaCl dans la détermination de la résistance globulaire, notamment les constatations faites couramment au cours du lavage des globules rouges au moyen de ce liquide. Un exemple nous fera comprendre :

Cherchons une solution de NaCl dans laquelle les globules rouges de l'homme ne s'hémo lysent pas. Supposons que ce liquide soit une solution de NaCl à 0.52 %. Centrifugeons, décantons le liquide surnageant et remplaçons-le par une nouvelle solution de NaCl à 52 % ; après nouveau mélange et une nouvelle centrifugation, le liquide surnageant sera légèrement rouge, alors que la première fois la solution de NaCl était incolore. Répétons l'opération : à chaque nouveau lavage, le liquide se colorera davantage. On voit donc que la répétition des lavages ne laisse pas intacts les globules sanguins.

La cause de ce phénomène et les moyens d'y obvier ont été étudiés dans notre laboratoire. Déjà en 1908, j'établis d'une manière certaine, à l'encontre des idées courantes, que les globules rouges contiennent du calcium ⁽¹⁾.

En 1912, SNAPPER ⁽²⁾ trouva que l'on faisait des erreurs dans les lavages au moyen de solutions au NaCl, erreurs auxquelles l'on peut remédier par addition d'un peu de calcium à la solution de NaCl. Plus tard, les recherches systématiques de BRINKMAN ⁽³⁾ montrèrent que la quantité de Ca qui doit être ajoutée ne peut être trop grande : elle ne peut varier que *dans des limites très restreintes* :

0,015-0.025 % CaCl_2 . 6 aq. c.-à-d. : 0.0010-0.0015 % Ions de Ca. ⁽⁴⁾

Ce facteur intervient non seulement pour le lavage des globules rouges, mais aussi dans la fixation de la courbe de résistance. Déjà un fait analogue avait été constaté en ce qui concerne l'épithélium glomé-

⁽¹⁾ HAMBURGER. *Zeitschr. f. physik. Chem.*, LIX, 1908, Festb. f. Prof. ARRHENIUS, 1908.

⁽²⁾ SNAPPER. *Biochem. Zeitschr.* XLIII, 366, 1912.

⁽³⁾ BRINKMAN. *Biochem. Zeitschr.*, IC, 101, 1919.

⁽⁴⁾ Une trop grande et aussi une trop petite quantité de Ca favorisent l'hémolyse, probablement par l'influence de la lécithine. NEUSCHLOSS (*Pflüger's Archiv.*, CLXXX, 17, 1920), trouva qu'une trop grande quantité d'ions de Ca a la même influence sur la tension superficielle d'une émulsion de lécithine et de NaCl qu'une quantité trop petite. Les limites sont très voisines.

rulaire ⁽¹⁾. Qu'avait-on trouvé ? Que cet épithélium est uniquement capable d'arrêter le glucose lorsque le liquide traversant les capillaires du glomérule contient une concentration en ions de Ca qui ne varie que dans d'étroites limites.

D'autre part, un phénomène analogue a été également découvert dans notre laboratoire, au sujet des mouvements de l'estomac par excitation du pneumogastrique ⁽²⁾, ainsi qu'à propos des mouvements ⁽³⁾ du rectum. On voit donc que pour que les cellules restent dans un état normal, elles doivent être plongées dans un liquide qui possède une quantité déterminée de calcium, ou plutôt une teneur déterminée en ions de Ca ; car c'est une question d'ions. — Pour obtenir un tel liquide, il faudrait que l'on prépare un mélange de sels tels qu'ils se présentent dans l'ultrafiltrat. — Une analyse quantitative minutieuse de ce liquide n'est d'ailleurs pas si simple. On a utilisé un autre procédé, dont nous ne parlerons pas ici.

Pour les globules de l'homme et ceux du lapin, on prépare la solution suivante : NaCl 0.7 %, CaCl₂ 6aq. 0.04 %, KCl 0.2 %, Na H CO₃ 0.18 %, avec une concentration en ions d'hydrogène = 0.45×10^{-7} . La concentration en ions d'Hydrogène peut être maintenue à ce taux par l'insufflation d'un peu de CO₂ et peut-être contrôlée au moyen d'un indicateur (rouge neutre). La couleur doit être semblable à celle que l'on obtiendrait en mélangeant 15 cc. d'une solution de 9.078 gr. de K₂ HPO₄ dans une litre d'eau à 0.5 cc. d'une solution de 11.07 gr. de Na₂ HPO₄ 2 aq. dans un litre d'eau en présence de rouge neutre (SØRENSEN) ⁽⁴⁾.

On peut obtenir, au moyen de ce liquide, le degré voulu d'hypotonie en changeant tout simplement la quantité de NaCl, la teneur en Ions de Ca restant inchangée, puisque dans le mélange précité le NaHCO₃ joue le rôle de tampon tel qu'on le voit dans la formule de RONA et TAKAHASCHI $[Ca^{++}] = k [H^{+}] [HCO_3^-]$, dans laquelle k est une constante et = 350. — Comme nous le voyons, la teneur en Ions de calcium est inversement proportionnelle à la teneur en Ions HCO₃ (Na HCO₃) et directement proportionnelle à la concentration en Ions d'Hydrogène. Nous pouvons faire permuter les deux ions l'un pour l'autre sans que pour cela la teneur en Ions de Ca soit affectée. Les solutions équilibrées de cette façon parurent réaliser, pour d'autres cellules également, le type du liquide artificiel le plus

⁽¹⁾ HAMBURGER et BRINKMAN. *Proceeding. Konink. Acad. v. Amsterdam.*: vol. XIX, 988, 997, 1917. — Vol. XX, 668, 1918. *Biochem. Zeitsch.*, **88** 97, 1918, **94**, 129, 131, 1919. *Brit. Med. Journ. March.*, 8, 1919.

⁽²⁾ BRINKMAN et VAN DAM. *Koninkl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam*. Séance du 18 décembre 1920.

⁽³⁾ BRINKMAN et VAN CREVELD, non encore publié.

⁽⁴⁾ SØRENSEN. *Compte-rendu Lab. de Carlsberg*, 7^{me} et 8^{me} vol., 1907 et 1910. Voyez aussi dans NEUBERG. *Der Harn*, II, p. 1396, 1911. Bon nombre d'articles du *Biochemische Zeitschrift*.

physiologique. Ces liquides furent employés notamment dans des expériences d'excitations du pneumogastrique ⁽¹⁾ provoquant des mouvements de l'estomac, et dans des expériences ayant pour objet les mouvements du rectum ⁽²⁾. Je tiens à le répéter : il est clair que pour maintenir ces cellules dans un état normal, *on doit les placer dans un milieu liquide qui, dans chaque cas, doit posséder une teneur déterminée en ions de Ca.*

En quoi consiste l'influence des ions de Ca ? Des recherches colloïdo-chimiques ont appris que le Na exerce sur la couche superficielle des globules une influence affaiblissante (lyotrope) : c'est pour cela qu'il favorise l'hémolyse (HÖBER). Plus tard, on constata que le Ca exerce une influence antagoniste et peut, de ce fait, neutraliser l'action favorisante du NaCl pour l'hémolyse.

La signification réelle des ions de Ca dans le degré d'hémolyse ressort d'une expérience de BRINKMAN ⁽³⁾. Cette expérience est la suivante.

Quand un commencement d'hémolyse a eu lieu grâce à une solution pure de NaCl, en réalité l'hémolyse paraît déplacée : en effet, la sortie des matières colorantes s'accompagne d'une mise en liberté de Ca. Ce Ca libéré est la cause de ce qu'un certain nombre de globules rouges ne s'hémo lysent plus, alors qu'ils ne supporteraient point sans hémolyse une solution pure de NaCl de la même hypotonie.

Plus la solution de NaCl est faible, plus grande la quantité de Ca mise en liberté, plus considérable est le retard de l'hémolyse.

La Figure 6 nous fera mieux comprendre ces faits :

On voit la différence entre la courbe de résistance déterminée par une solution pure de NaCl et la courbe de résistance calculée au moyen de solutions salines équilibrées, c'est-à-dire au moyen des solutions à teneur constante en ions de Ca et teneur différente en ions de NaCl.

En considérant ce qui précède, on serait tenté de substituer à la solution de NaCl employée jusqu'ici la solution équilibrée décrite ci-dessus. Mais on ne peut méconnaître les difficultés de travail imposées par cette dernière solution : d'ailleurs sa préparation nécessite une grande expérience. C'est pourquoi je me suis demandé

⁽¹⁾ BRINKMAN et VAN DAM. *Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam Zitting*, 18 décembre 1920.

⁽²⁾ BRINKMAN et VAN CREVELD, sous presse.

⁽³⁾ BRINKMAN. *Biochem. Zeitschr.*, 101, 1919.

si l'on ne pouvait conseiller un liquide plus simple pour réaliser ce que BRINKMAN obtint avec ses solutions salines équilibrées : je pense que ce liquide pourrait être le Na_2SO_4 en solution. Ce qui détermina mon choix pour le Na_2SO_4 se déduit de ce qui précède.

Abstraction faite de l'échange entre les Ions, nous trouvons encore, à l'examen, d'autres considérations qui plaident en faveur du Na_2SO_4 . Pour être bref ne relevons que deux faits : tout d'abord, on se demande si le Na du Na_2SO_4 n'exerce pas une influence lyotrope ; c'est indubitablement le cas, mais cette influence est neutralisée du fait de l'action de l'Ion SO_4 ; pensons ensuite à la signification spéciale de l'attraction électrostatique (1) pour l'eau exercée par l'Ion SO_4 bivalent.

En se plaçant à un point de vue purement pratique, on peut constater que, tant pour le lavage que pour la détermination de la résistance osmotique, le Na_2SO_4 donne les mêmes résultats que la solution de RINGER — conçue théoriquement et minutieusement équilibrée et que l'ultrafiltrat du sérum.

Il n'en est pas de même avec l'oxalate de K employé par WIDAL (2) et ses élèves. L'Ion oxalique fixe le Ca et n'est pas capable de neutraliser l'action lyotrope du Na. L'activité lyotrope de l'oxalate de K rend indispensable, suivant les renseignements de MAY, une centrifugation rapide aussitôt que le sang a été versé dans l'oxalate ; faute de quoi, l'on voit les globules sanguins devenir plus fragiles. Il va de soi que cette substance ne peut être utilisée pour déterminer une courbe de Résistance primaire puisque pour celle-ci la résistance doit toujours être supérieure à celle des globules sanguins originaux recouverts de plasma ; d'ailleurs, il semble aussi que ni WIDAL, ni MAY n'aient observé cette augmentation de résistance que l'on trouve quand on emploie une solution équilibrée de sel ou une solution de Na_2SO_4 .

Pour être complet, mentionnons, qu'après lavage à l'oxalate de K, les deux auteurs dessinent leur courbe de Résistance en se servant de solution pures de NaCl ce qui précisément fausse les résultats, comme l'ont prouvé, dans mon laboratoire, SNAPPER et BRINKMAN.

Avant de passer à la description de quelques épreuves à l'aide du

(1) J. LOEB. *Science*, LIII, 77, 1921.

(2) WIDAL, ABRAMI et BRULÉ. *Presse Médicale*, octobre 1907. Voyez aussi MAY, l. c.

Na_2SO_4 en solution, je désire attirer l'attention sur le fait que parfois le Na_2SO_4 « pour analyse » présente une réaction acide, probablement à cause du NaHSO_4 . Les globules sanguins rouges deviennent alors bruns-gris par décomposition de l'hémoglobine. C'est pourquoi il faut veiller à ce que la solution initiale soit neutre. Neutralisons donc d'avance au moyen d'une solution de NaHCO_3 à 5 % et employons le rouge neutre comme indicateur.

Expériences sur l'emploi du Na_2SO_4 dans des questions relatives à la régénération des globules sanguins après une saignée.

Je citerai exclusivement les expériences au Na_2SO_4 qui indiquent une influence de la nourriture sur la régénération.

Deux jeunes lapins de 1800 gr. furent saignés de 25 resp. 20 cc. de sang ; après quoi ils reçurent une nourriture différente. L'un fut nourri d'avoine et d'herbe, l'autre uniquement d'herbe.

Les considérations qui nous firent adopter ce mode d'expérimentation furent les suivantes : la hausse de résistance constatée après lavage des globules au moyen d'une solution saline isotonique équilibrée nous avait donc appris que lorsque les globules sanguins se trouvent dans le plasma, ils s'enduisent d'une couche de lipoides qui abaisse leur résistance ; cette couche peut être enlevée par lavage, et restituée lorsque les globules, après lavage, sont remis en contact avec du sérum ⁽¹⁾.

Le pouvoir hémolysant de cette couche nous est donnée par le quotient $\frac{\text{cholestérine}}{\text{lécithine}}$ ou son équivalent $\frac{\text{cholestérine}}{\text{acides gras totaux}}$ (coefficient lipocytyque de MAYER et SCHAEFFER). Il parut important de savoir si cette valeur, après détermination de la résistance au moyen de Na_2SO_4 , dépendait de l'alimentation de l'animal ou si des modifications éventuelles de celle-ci pouvaient apporter des changements dans la résistance ou la régénération. Il avait été établi par des recherches de BLOOR et ses élèves, de MAYER et SCHAEFFER, TERROINE, WACKER et HUECK ⁽²⁾ etc., que chez le lapin, le coefficient de MAYER et SCHAEFFER est fonction de l'alimentation. Il était d'ailleurs déjà démontré par des lavages au moyen des solutions salines équilibrées ⁽³⁾ :

⁽¹⁾ BRINKMAN et VAN DAM. Studien zur Biochemie der Phosphatide und Sterine, I, II, III. *Biochem. Zeitschr.*, CVIII, 1920.

⁽²⁾ BLOOR. *Journal of Biol. Chem.*, XXV, 5, 77, 1916. — MAYER et SCHAEFFER, *Journal de Physiol. et de Pathol. générale*, XVI, 1 et 23, 1914. — TERROINE, *ibid.*, XVI, 386. — WACKER et HUECK, *Biochem. Zeitschr.*, C, 84, 1919. — LINDEMANN. *Zeitschr. f. Geburtshilfe u. Gyn.*, LXXIV, 814, 1913.

⁽³⁾ BRINKMAN et VAN DAM, *Biochem. Zeitschr.*, CVIII, 61, 1920.

1° Que chez les lapins à jeun, la résistance était augmentée et la régénération très minime.

2° Que l'addition de lécithine à la nourriture provoquait de l'hémolyse intravitale et d'autre part, causait en même temps une régénération intense.

Ceci prouve que chez les lapins à jeun, la concentration de lipoïdes était petite et que, par conséquent, les globules rouges se comportaient comme si la résistance était augmentée par l'enlèvement de la lécithine au moyen de lavages. En outre, après saignée, il n'y avait pas de régénération, comme l'indiquent d'ailleurs très bien les courbes primaires de résistance. Par addition de lécithine pure à la nourriture, les globules sanguins récupéraient une surface diminuant leur résistance, favorisant l'hémolyse ; d'autre part la moelle osseuse, stimulée, présentait une activité plus grande.

Si ce raisonnement était exact, c'est-à-dire si la modification du sang dépendait dans une large mesure d'une alimentation riche en lipoïdes, nous devrions obtenir les mêmes phénomènes aussi bien en donnant aux lapins une alimentation suffisante en calories mais pauvre en graisse (herbe), qu'en les affamant. On pourrait obtenir facilement le contraire, une alimentation riche en lipoïdes, en ajoutant de l'avoine à l'herbe.

Les numérations de globules faites dans notre laboratoire par K. J. FERLINGA viennent à l'appui de cette thèse. FERLINGA vit dans notre laboratoire que les lapins nourris presque exclusivement d'herbe en été, présentent, après la saignée, une très faible régénération : un supplément d'avoine fait immédiatement monter le nombre des globules sanguins.

Pour les expériences suivantes j'ai utilisé de jeunes lapins. Il ressortira de mes déterminations que des lapins à l'herbe possèdent sur leurs globules une faible quantité de lipoïdes susceptibles d'être enlevées par lavage, que les lapins à l'avoine en ont, au contraire, beaucoup.

Ce fait est surtout évident quand on compare les renseignements recueillis chez les deux lapins au cinquième jour de l'alimentation : chez le lapin herbivore, il existe peu de différence entre la résistance de sang lavé et du sang non lavé. Chez le lapin à l'avoine, la différence est grande. En ce qui concerne la régénération, mes prévisions se sont également vérifiées.

Avant de citer les expériences, je désire signaler que dans toutes les courbes suivantes les phénomènes de régénération sont obtenus avec le plus de netteté dans les tracés de résistance primaire et qu'elle correspondent avec les résultats des déterminations volumétriques des globules sanguins.

Afin de contrôler la marche de la régénération, on fit, en plus des

numérations, des déterminations de volume des globules rouges dans 0.08 cc de sang.

Dans ce but, on prélevait, chaque jour, un peu de sang dans un tube fermé, le défibrinait au moyen de perles de verre et le filtrait ensuite ; 2 cc. d'une solution isotonique de (Na_2SO_4 . 10 aq. à 3 %) étaient alors introduits, dans l'entonnoir du chonohématocrite ⁽¹⁾ et additionnés de 0.08 cc. de sang.

Une longue centrifugation nous donnait un sédiment de volume fixe. Le volume moyen obtenu après deux essais était considéré comme le volume des globules sanguins de 0.08 cc. de sang. La partie capillaire des petits tubes possède une capacité de 0.04 cm. Cet espace est divisé en 100 parties égales, de sorte que chaque division contient un volume de 0.0004 cc.

On déduira des chiffres mentionnés en dessous de chaque expérience que nous établissons le parallèle entre les renseignements fournis sur la régénération par les déterminations de résistance et ceux fournis par les déterminations volumétriques.

Afin de rendre plus saillants les résultats des expériences décrites, nous les avons mis en diagrammes. Le compte rendu des expériences faites chez un même animal pendant différents jours, est résumé en une seule figure ; les diverses expériences sont représentées par des traits différents. Dans les figures 1 et 3, le degré d'hémolyse est renseigné directement, tel que nous l'indiquent les tableaux. Dans les figures 2 et 4, correspondant avec les figures 1 et 2, le nombre de globules d'une résistance *déterminée* est indiqué *séparément*. L'arrangement et la signification des figures 2 et 4 ressortiront plus clairement de l'exemple suivant : On voit, d'après le tableau n° 1 (lapin à l'avoine après un jour), que 35 % des globules non lavés sont hémolysés par le Na_2SO_4 . 10 aq. à 1.5 %, alors que 75 % de la quantité totale sont hémolysés par le Na_2SO_4 en solution à 1.25 %. Par conséquent, 40 % des globules correspondent à une solution de Na_2SO_4 à 1.25 %. Ceci se trouve exprimé par le point culminant de la ligne ininterrompue de la figure II. La ligne en pointillé indique approximativement 60 — 30 = 30 % des globules lavés résistant à une solution de sulfate à 1.25 %.

(1) HAMBURGER, *Journal de Physiol. normale et path.* 1900. *Biochem. Zeitschr.* 1, 263, 1906 ; LXXVI, 415, 1915. *Proc. Koninkl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 28 avril 1916 (anglais).

Lapin à l'avoine (1^{er} jour)

Saignée : ± 25 cc.

Détermination de la résistance dans des solutions de Na_2SO_4 10 aq.

% Na_2SO_4 10 aq	% d'hémolyse	
	non lavé	lavé au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	5 %
1.75	10	10
1.50	35	30
1.25	75	60
1.00	100	75
0.75	100	80

Cette expérience montre que les globules deviennent beaucoup plus résistants par le lavage. La détermination du volume des globules dans 0.08 cc. de sang n'a pas eu lieu le 1^{er} jour.

Lapin à l'herbe (1^{er} jour)

Saignée : ± 20 cc.

Détermination de la résistance dans des solutions de Na_2SO_4 10 aq.

% Na_2SO_4 10 aq	% d'hémolyse	
	non lavé	lavé au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	3	3
1.50	40	30
1.25	70	60
1.00	95	85
0.75	100	90

Les globules lavés sont également plus résistants ici. Le volume des globules de 0.08 cc. n'a pas été déterminé le premier jour.

Même lapin à l'avoine (2^e jour)

Détermination de résistance comme ci-dessus.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	1	0
1.50	25	18
1.25	80	75
1.00	100	85
0.75	100	95

Résistance accrue par lavage. Détermination du volume de 0.08 cc. sang défibriné dans 2 cc. Na₂SO₄ à 3 % : 39.5 et 38.5 divisions, après centrifugation de 2 heures ; en moyenne 39 divisions.

Même lapin à l'herbe (2^e jour).

Perte de sang : ± 6 cc.
Résistance déterminée comme ci-dessus.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	0	1
1.50	45	25
1.25	70	80
1.00	98	95
0.75	100	95

Différence minime entre les deux états lavé et non lavé probablement parce qu'il y a peu de régénération. Détermination du volume comme dessus ; moyenne 47.25 divisions.

Lapin à l'avoine (3^e jour)

Saignée : $\pm$ 6 cc.

Détermination de résistance comme dessus.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	1	0
1.50	20	3
1.25	75	55
1.00	95	80
0.75	100	90

La régénération est nettement visible non seulement chez les globules lavés, mais aussi chez ceux qui ne furent pas lavés.
Détermination du volume comme ci-dessus; moyenne 43.25 divisions.

Lapin à l'herbe (3^e jour)

Saignée : $\pm$ 6 cc.

Détermination de résistance comme avant.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	0	0
1.50	15	10
1.25	60	60
1.00	98	95
0.75	100	100

Détermination de volume comme auparavant; moyenne 42 divisions.

Lapin à Pavoine (4^e jour)

Saignée : $\pm$ 6 cc.

Détermination de résistance comme ci-dessus.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	1	0
1.50	10	3
1.25	70	20
1.00	90	75
0.75	100	90

Résistance augmentant toujours en comparaison avec les jours antérieurs.

Détermination du volume comme ci-dessus : moyenne 53.75 divisions.

Lapin à l'herbe (4^e jour)

Saignée : 6 $\pm$ cc.

Détermination de résistance comme ci-dessus.

% Na ₂ SO ₄ . 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	0	0
1.50	12	1
1.25	65	45
1.00	95	80
0.75	100	95

Détermination du volume comme avant : moyenne 44 divisions.

Lapin à l'avoine (5^e jour)

Saignée : $\pm$ 6 cc.

La détermination de résistance comme avant.

% Na ₂ SO ₄ 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	0	0
1.50	10	1
1.25	65	20
1.00	85	60
0.75	100	85

Détermination du volume comme auparavant; moyenne 56 divisions.

Lapin à l'herbe (5^e jour)

Saignée : $\pm$ 6 cc.

Détermination de résistance comme avant.

% Na ₂ SO ₄ 10 aq	% d'hémolyse	
	sans lavage	lavage au sulfate à 3 %
2.00 %	0 %	0 %
1.75	2	0
1.50	15	20
1.25	70	60
1.00	95	80
0.75	100	95

Détermination du volume comme auparavant; moyenne 54.75 divisions.

Fig. 1

Fig. 2

Sur les figures 2, 3 et 4 lire Na_2SO_4 10 aq au lieu de Na_2SO_4 aq.

Fig. 3

Fig. 4

De cette manière, nous nous faisons une meilleure idée du degré de résistance de chaque sorte de globules prise séparément. Il va de soi que la somme des teneurs en pourcentage doit toujours faire 100.

Examinons de plus près la figure 1. Il s'agit ici du *lapin nourri à l'avoine* du premier au cinquième jour. Les *lignes pleines* indiquent les globules *non lavés*, les *lignes interrompues* les globules *lavés*. (Le premier jour, les lignes sont fines ; les jours suivants elles sont de plus en plus *épaisses* ; en outre, les globules *non lavés* sont représentés en chiffres *romains*, tandis que les globules *lavés* le sont en chiffres *arabes*). Nous assistons à une régénération croissante. La courbe du cinquième jour, par exemple, se trouve pour ainsi dire partout inférieure à la courbe des jours précédents. Il en est de même pour le quatrième jour par rapport au troisième et ainsi de suite. Ce fait est surtout visible lorsqu'on prend comme point de comparaison la courbe de même espèce du lapin nourri à l'herbe (fig. 3). Chez celui-ci, il est vrai, toutes les lignes sont pour ainsi dire confondues : il y a en effet peu de régénération ; les globules *lavés* du lapin nourri à l'avoine nous montrent le même fait d'une façon plus claire encore (voyez la ligne interrompue de la figure 1), tandis que cela n'est pas ou presque pas le cas chez le lapin nourri à l'herbe (figure 3, ligne interrompue.)

A l'examen des courbes II et IV qui nous donnent le nombre relatif des globules qui hémolysent encore pour une concentration *déterminée* de Na_2SO_4 , nous voyons aussi la régénération forte chez le lapin *nourri à l'avoine* (fig. 2) et la régénération presque absente du lapin nourri à l'herbe (fig. 4). Les points les plus élevés de la fig. 2 sont transportés, au quatrième et cinquième jour (ligne 4--- et 5---) vers une toute autre concentration de Na_2SO_4 (de 1.25 % à 1.00 %) tandis que, dans la fig. 4, cela ne se présente pas.

Aussi le *nombre* de globules qui sont détruits par une solution de Na_2SO_4 10 ag. à 1.00 % est beaucoup moins élevé chez le *lapin nourri à l'avoine* que chez le lapin nourri à l'herbe. Pour le lapin nourri à l'avoine, la moyenne se rapproche de 20, tandis que pour le lapin à l'herbe ce nombre varie de 25 à 40.

Nous avons également représenté graphiquement chaque jour le *volume* des globules rouges. On constate aisément l'ascension continue de la ligne pleine qui représente le volume des globules rouges

du lapin nourri à l'avoine, tandis que la ligne interrompue nous indique le volume des globules chez le lapin nourri à l'herbe.

Si, chez le *lapin nourri à l'avoine*, le gain en globules nouveaux va de 39 à 56, c'est-à-dire 17 ou $X \pm 43.5\%$, chez le lapin nourri à l'herbe, après la grande saignée du premier jour, il n'y a qu'un gain de 51.75 à 47.25 = 4.5 ou $\pm 9.5\%$.

Ajoutons que tout aussi bien que le sang de lapin, le sang *humain*

Fig. 5.

se prête à ces expériences et que le lavage au moyen d'une solution de Na_2SO_4 10 aq isotonique nous donne une augmentation de résistance. Nous ne donnons pas de chiffres afin de ne pas être trop long. D'après WIDAL cette différence n'existe pas quand le lavage se fait à l'oxalate de K. Il y voit un avantage ; ce n'est pas notre avis.

Enfin, la figure 6 nous montre la différence entre l'image que nous offre le sang quand il est traité au moyen de solutions pures de NaCl et l'image que l'on obtient au moyen de solutions salines équilibrées, dont les degrés d'hypotonie sont obtenus en variant simplement la teneur en NaCl. Ces courbes correspondent aux courbes des fig. 2 et 4, c'est-à-dire qu'elles renseignent sur le nombre de globules de résistance différente ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Voyez mon article non encore publié au sujet de : « Résistance », dans ABDERHALDEN'S *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*.

Pour les expériences ci-dessus décrites et les expériences s'y rapportant, nous eûmes la précieuse collaboration de MM. H.-J.-H. VAN LIENDEN, M.-S. VAN RYN, R.-J. HAMBURGER et R. ROELINK.

Fig. 6.

RÉSUMÉ

1. Des solutions de Na_2SO_4 10 aq, neutralisées le cas échéant au moyen de NaHCO_3 , se prêtent très bien au lavage des globules ainsi qu'à la détermination du nombre relatif de globules rouges de résistance différente (courbe de résistance osmotique.)

2. Ces courbes de résistance osmotique s'obtiennent :

a) au moyen de globules déplasmatisés.

b) au moyen de globules non déplasmatisés.

ad a) Pour la « déplasmatisation » il faut laver deux ou trois fois les globules au moyen d'une solution isotonique à 3 % de sulfate de soude

Na_2SO_4 10 aq. : les globules sont ainsi débarrassés de la petite couche de lécithine adsorbée du plasma. Nous pouvons nous représenter que c'est dans cet état que les globules quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation. Ces globules déplasmatisés donnent la *courbe de résistance primaire*. (Voyez page 646).

ad b) Les globules non déplasmatisés possèdent donc encore la petite couche adsorbée de plasma. L'image de la résistance obtenue au moyen de ces globules s'appelle *courbe de résistance secondaire*.

3. Les globules deviennent plus résistants à la suite de leur lavage au moyen d'une solution de Na_2SO_4 ; ce fait est dû à la perte de la lécithine qui les entoure et qui possède la propriété de diminuer la résistance.

4. L'emploi d'une solution pure de NaCl n'est pas à conseiller pour fixer la courbe de résistance primaire, moins encore pour fixer celle de résistance secondaire, ceci à cause de l'influence lyotrope de cette solution, influence qui peut d'ailleurs être neutralisée par addition d'une quantité *déterminée* d'ions de calcium ; cette neutralisation existe dans l'ultrafiltrat du sérum et aussi dans une sorte de solution de RINGER *modifiée* dont la teneur en ions de Ca est maintenue *constante* d'une façon appropriée. Il ne faut pas songer à l'emploi d'ultrafiltrat pour la détermination de la résistance chez l'homme ou même chez les animaux, parce que l'on a besoin d'une quantité de sang trop grande ; d'ailleurs la concentration en ions d'hydrogène devrait de nouveau être remise au point.

L'emploi de solutions salines équilibrées est d'un emploi très difficile pour des mains non exercées.

La solution de Na_2SO_4 donne identiquement les mêmes résultats que la solution saline théoriquement inattaquable — ce qui n'est pas le cas de l'oxalate de potassium.

5. Grâce à l'emploi du Na_2SO_4 dans la détermination de la courbe de résistance primaire et de la courbe de résistance secondaire, on peut facilement résoudre une quantité de problèmes concernant la mort et la régénération des globules sanguins. C'est ainsi que nous avons établi combien une alimentation contenant de la graisse et de la

lécithine est nécessaire à la régénération du sang des lapins anémiés par une saignée (lapin nourri à l'avoine comparé au lapin nourri à l'herbe).

En outre, l'emploi du Na_2SO_4 nous fournit un moyen très simple de résoudre la question de savoir si la modification de la résistance dépend des globules rouges eux-mêmes, du plasma ou des deux à la fois.