

Hematological data on experimental lead poisoning in homeothermal animals, with the aid of phase contrast microscopy

[Current List of Medical Literature, #38587, October 1958]

MÉMOIRES ORIGINAUX

Recherches hématologiques dans l'intoxication saturnine expérimentale des animaux homéothermes, à l'aide du microscope à contraste de phases.

Par MM.

M. WASSERMANN, G. MIHAIL et V. COJOCARU

(Iassy).

On considère actuellement que trois épreuves biologiques sont fondamentales pour dépister la saturnisme : la numération des érythrocytes à granulations basophiles, le dosage de la coproporphyrinurie et le dosage du plomb dans le sang et dans l'urine.

Ces épreuves présentent des importantes variations individuelles. Prises séparément, elles ne réussissent pas à nous donner une image réelle du degré d'intoxication, prises dans leur ensemble les épreuves ne présentent point une corrélation rigoureuse. Les concentrations du plomb dans le sang et dans l'urine ne correspondent pas à l'intensité de la coproporphyrinurie et à la proportion des érythrocytes à granulations basophiles.

Il en résulte la nécessité d'approfondir ces recherches afin d'établir le mécanisme et les lois de l'évolution de ces troubles. L'apparition de nouveaux moyens d'investigation facilite cette nécessité. Nous présentons dans cette note les résultats de l'examen hématologique effectué à l'aide du microscope à contraste de phases dans l'intoxication saturnine expérimentale, en poursuivant dans quelle mesure cette méthode facilité la mise en évidence des érythrocytes à granulations basophiles et d'autres changements des éléments figurés du sang.

L'absorption du plomb dans l'organisme détermine une importante hémolyse ; une partie de l'hémoglobine libérée est transformée, au niveau du système réticulo-endothélial, en bilirubine, qui exerce une action stimulante sur l'érythropoïèse.

Le constituant fondamental du cytoplasme des éléments de la série érythrocytaire est formé par les protéines acides, qui ont le double rôle de fournir les éléments nutritifs nécessaires à la maturation du noyau et à la formation de l'hémoglobine.

L'absorption du plomb trouble les processus cytoplasmiques d'oxydoréduction en inhibant l'utilisation complète des protéines acides. Les petites quantités de protéines qui n'ont pas été utilisées constituent les granulations basophiles. La mise en évidence : des érythrocytes à granulations basophiles par fixation et coloration des préparations avec les colorants basiques, des réticulocytes par coloration vitale et des érythrocytes polychromatophiles, a probablement comme substratum la persistance des protéines acides dans les érythrocytes, qui prennent différents aspects microscopiques selon la technique utilisée.

Dans une recherche antérieure, en utilisant l'examen des frottis colorés sur fond noir, nous avons établi que le nombre des érythrocytes à granulations basophiles constaté est presque le double de celui obtenu par l'examen effectué au microscope habituel.

Dans ces recherches nous avons effectué l'examen comparatif sur fond noir et l'examen au microscope à contraste de phases. Les préparations non colorées donnent des images microscopiques dues aux différences de réfraction des diverses parties constitutives. Les différences de réfraction font dévier différemment les rayons qui passent à travers la préparation et donnent des images d'interférence.

Le principe du fonctionnement du microscope à contraste de phases est la transformation des indices de réfraction des diverses structures de l'objectif, en variant l'intensité lumineuse.

Les avantages du microscope à contraste de phases consistent en ce que les images qu'il donne sont fort riches en détails des objets non colorés ou vivants, détails complètement invisibles à la lumière habituelle, avec le diaphragme presque fermé, où à lumière latérale.

Cette technique permet l'examen des différentes structures microscopiques réelles sans l'intervention des facteurs perturbateurs représentés par les fixateurs ou les colorants, aussi bien pour le diagnostic que pour les recherches scientifiques.

Dans les recherches concernant l'étude des modifications morphologiques sanguines on a utilisé 10 lapins adultes pesant de 2 000 à 2 500 g. Le sang a été prélevé de la veine marginale de l'oreille. Chez 6 de ces lapins l'intoxication saturnine a été provoquée par l'injection intraveineuse journalière d'acétate de plomb (solution à 1 p. 100) à la dose de 5 mg par kilo corporel. On a introduit 25 à 30 mg d'acétate de plomb, quantité suffisante pour provoquer une intoxication intense exprimée par l'apparition de nombreuses érythrocytes à granulations basophiles et d'autres troubles hématologiques.

L'analyse du sang pour les examens sur fond noir au microscope à lumière directe a été faite, sur des frottis colorés selon la méthode Romanovski-Giemsa. Pour l'examen au microscope à contraste nous avons utilisé deux méthodes :

a) En fixant une goutte, extrêmement petite entre la lame et la lamelle, ce qui a permis d'obtenir par capillarité une couche cellulaire aux éléments isolés, condition essentielle pour l'examen au microscope à contraste de phases.

b) En prélevant deux gouttes de sang dans 1 cm³ de citrate de soude 3 à 8 p. 100 donnant une suspension de sang suffisamment diluée, de laquelle on fixe 1 goutte entre la lame et la lamelle.

Après avoir vérifié les résultats obtenus, dans plusieurs cas, par les deux méthodes nous avons constaté une concordance. Nous nous sommes arrêtés à la technique de la fixation directe du sang prélevé entre la lame et la lamelle, qui a donné des résultats satisfaisants dans la 1^{re} heure après le prélèvement. Les examens ont été faits avec des dispositifs à contraste de phases Zeiss selon le modèle de Zernicke, les microphotographies étant obtenues avec l'appareil Fed avec film fluororapide.

Si l'on obtient une couche unicellulaire, on évite la production d'artefacts et l'examen au microscope à contraste de phases s'effectue sans difficulté. Les différentes techniques indiquées par Bessis et celles que nous avons utilisées évitent tout changement morphologique des éléments sanguins figurés.

Pour établir l'origine des granulations basophiles les recherches ont été faites sur des pigeons, en suivant la même technique.

RÉSULTATS

Aspects normaux. Tous les animaux ont été soumis, pendant les 10 premiers jours à des examens de contrôle pour vérifier, sur frottis colorés examinés au microscope à lumière directe sur fond noir, si la série leucocytaire ne présente pas des altérations

et aussi si les érythrocytes ne contiennent aucune granulation. On a effectué en même temps des observations au microscope à contraste de phases.

Au microscope à contraste de phases les hématies du pigeon ont une forme ellipsoïdale, dont le grand axe varie entre 11,8 et 14,3 μ et le petit axe entre 5,7 et 7,1 μ . Le contour est bien distinct et régulier et l'on observe au centre le noyau, qui, reproduisant fidèlement, la forme de la cellule, est plus dense, picnotique, formé d'amas de chromatine plus ou moins régulièrement disposés. La majorité des hématies ont un seul noyau, présentant rarement une légère strangulation. Le protoplasme est plus clair, homogènement distribué, il ne présente aucune modification. Dans certaines hématies on observe dans le protoplasme une petite formation ronde, régulière, unique plus dense, située d'habitude à l'un des pôles hématiques (corpuscules chromatiques paranucléaires J. Jolli). Les éléments blancs ont une forme très variée. Les lymphocytes et monocytes prédominent dans la formule ; 50 p. 100 de la formule leucocytaire est formée de lymphocytes de petite et grande dimension. On observe sur les préparations des thrombocytes en grand nombre.

Nous avons réussi à établir que chez les lapins dont le sang est examiné au microscope à contraste de phases (en concordance avec les observations faites par de nombreux auteurs) les érythrocytes apparaissent comme des disques sombres dans la différenciation d'une membrane, beaucoup d'entre eux apparaissent avec un centre plus clair, expression de la forme biconcave (fig. 1).

L'apparition de la forme épineuse donne à l'érythrocyte un aspect irrégulier, ayant de grandes épines situées dans divers plans ; en manœuvrant le viseur, on peut vérifier que le centre des épines paraît plus éclairé que son contour sombre.

Dans la série blanche les granulocytes apparaissent avec un noyau de couleur cendrée, où l'on peut distinguer une concentration de chromatine sous la forme d'une tache plus sombre. Dans le granulocyte éosinophile, les granulations sont évidentes avec leur aspect sombre ; elles ont une grandeur sensiblement égale (fig. 2). La plupart sont sphériques. Dans le granulocyte neutrophile les granulations apparaissent bien plus petites, d'intensité variable du noir au cendré, inégales, couvrant souvent le noyau.

Le lymphocyte (fig. 3) se présente avec les caractères connus de la disproportion entre le grand noyau circulaire et le cytoplasme réduit, lumineux, dans lequel on trouve de nombreuses granulations inégales, tantôt punctiformes, tantôt linéaires, représentant l'appareil mitochondrial qui, en coloration panoptique n'apparaît pas coloré.

On identifie le monocyte au microscope à contraste de phases par l'aspect réniforme du noyau, avec la chromatine inégale, répartie en amas d'une certaine grandeur.

Dans le cytoplasme clair et abondant du monocyte, on trouve des granulations très fines uniformément réparties.

LES ASPECTS DU SANG DANS L'INTOXICATION SATURNINE EXPÉRIMENTALE

En nous basant sur nos expériences antérieures, nous avons vérifié, à nouveau, que du 8^e au 10^e jour, l'examen sur fond noir, des frottis colorés décèle l'apparition des granulations basophiles dans les érythrocytes des lapins. Après un intervalle de 15 à 30 jours on observe les mêmes modifications dans les hématies des pigeons.

En comparant journallement les résultats de l'examen du sang des lapins soumis à l'intoxication saturnine effectué sur fond noir et au microscope à contraste de phases, nous n'avons pas observé le moindre décalage en ce qui concerne l'apparition des érythrocytes à granulations basophiles.

L'examen au microscope à contraste de phases nous a conduits à faire dans l'intoxication saturnine les constatations suivantes :

L'érythrocyte à granulations basophile peut-être facilement identifié par rapport

Au cours de l'intoxication saturnine, on aperçoit aussi des vacuoles dans les érythrocytes à granulations basophiles. Dans les hématies des pigeons, les granulations basophiles sont localisées dans le cytoplasme de l'hématie disposé dans la région périnucléaire, ayant dans la majorité des cas la même densité que le noyau. A côté des modifications protoplasmiques, on observe des modifications du noyau de l'hématie comme la diminution de la densité traduite par une pâleur accentuée du noyau (fig. 9, 10, 11). Nous considérons cette pâleur comme résultant des modifications chimiques qui se produisent dans la cellule à cause de l'agressivité du plomb, ce qui s'exprime par le changement de l'indice de réfraction de la structure nucléaire.

A côté de ces modifications, (apparition des granulations basophiles) on observe aussi d'importantes altérations de la structures des cellules de la lignée blanche. On trouve donc de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme du granulocyte neutrophile tandis que les granulations apparaissent plus irrégulières avec à la périphérie des amas de grandes granulations sombres; ce sont probablement des granulations toxiques (fig. 7).

On trouve également des altérations très marquées dans les lymphocytes, où la chromatine apparaît entassée en pelotes sombres, laissant des zones lumineuses assez étendues, tandis que l'on observe dans le cytoplasme de grandes vacuoles périnucléaires et des granulations inégales, irrégulières (fig. 8). Nous avons observé dans le cytoplasme du monocyte de nombreuses vacuoles et un contour plus irrégulier.

L'étude des thrombocytes et des éléments qui ne sont pas arrivés à maturité de la lignée rouge et blanche, qui apparaissent dans les phases avancées de l'intoxication saturnine, constituera l'objet d'une étude ultérieure qui portera aussi sur les modifications du myélogramme.

Il résulte donc que, dans les conditions de l'intoxication expérimentale par le plomb l'étude au microscope à contraste de phases permet d'identifier les érythrocytes à granulations basophiles sans coloration vitale ou post-vitale. On constate, en même temps, à l'aide de cette technique qu'à côté des érythrocytes à granulations basophiles on trouve encore d'autres altérations importantes dans la lignée érythrocytaire et dans la lignée leucocytaire.

DISCUSSIONS

Quant à l'origine des granulations basophiles considérée, par divers auteurs comme protoplasmique ou nucléaire, nos observations, faites à l'aide du microscope à contraste de phases, confirment les résultats obtenus par Preger, qui en colorant avec du vert-méthyl-pyronine les frottis de sang des pigeons soumis à l'intoxication saturnine n'a obtenu que la coloration des noyaux. Nous avons observé l'intégrité du noyau dans l'hématie, même lorsque le nombre des granulations dans les hématies augmente. Ces faits viennent à l'appui de l'hypothèse de l'origine cytoplasmique des hématies à granulations basophiles.

Jusqu'à l'heure actuelle le diagnostic morphologique de l'intoxication par le plomb utilise la technique du frottis fixé et coloré. L'examen ultramicroscopique des préparations fraîches ainsi que celui des préparations fixées non colorées ne réussit pas à mettre en évidence les granulations basophiles dans les érythrocytes. Ainsi qu'il résulte de nos recherches, l'utilisation du microscope à contraste de phases constitue un facteur important dans la recherche de ces modifications qui indiquent une profonde altération des érythrocytes.

Le microscope à contraste de phases nous a révélé, en même temps le fait très important que l'intoxication saturnine expérimentale détermine, à côté de l'apparition des granulations basophiles dans les érythrocytes, d'autres modifications érythrocytaires (vacuollisations) ainsi que des altérations des cellules leucocytaires.

P. Morel, L. Roche et J. Baron, en étudiant la valeur diagnostique du myélogramme dans l'intoxication saturnine, décrivent comme aspect cytologique caractéristique de la moelle osseuse l'existence des érythroblastes à granulations basophiles, des hématies vacuolaires à granulations et de l'hyperplasie microphagique.

Ces auteurs ont constaté que les modifications du myélogramme se produisent avant l'apparition des hématies à granulations basophiles.

Ces faits confirment nos observations par rapport à l'existence des hématies vacuolaires que nous trouvons dans le sang périphérique des animaux soumis à l'intoxication saturnine expérimentale.

Nous considérons que les hématies à granulations basophiles ainsi que les hématies vacuolaires à granulation basophile représentent des stades différents de la réponse de la série rouge à l'agression toxique du plomb.

Le microscope à contraste de phases nous offre la possibilité de faire l'examen de l'appareil mitochondrial dans le sang frais, non modifié par les différents fixateurs, en donnant la possibilité de mettre en évidence les altérations plus fines produites dans les cellules sanguines pendant l'intoxication saturnine expérimentale.

Ces constatations permettront une étude plus approfondie de nombreux problèmes soulevés par cette intoxication sous son aspect hématologique. Il faut rechercher, en premier lieu, les altérations qui indiquent que le processus métabolique ne se limite pas au trouble du métabolisme des protéines acides des érythrocytes. Les aspects que nous avons signalés réclament une étude plus approfondie de l'érythroleucopoïèse médullaire.

Nos recherches ont été effectuées dans les conditions d'une intoxication expérimentale aiguë et pour cette raison nous ne pouvons faire des appréciations sur l'extension de cette méthode dans le dépistage du saturnisme professionnel. Comme le microscope à contraste de phases nécessite l'examen de préparations fraîches, dans la première heure après le prélèvement, cette méthode ne pourrait pas être considérée, pour le moment, comme méthode d'usage courant dans des conditions pratiques, ce qui n'exclut pourtant pas son utilisation par le prélèvement du sang citraté.

CONCLUSIONS

Nous avons cherché à préciser, par l'emploi du microscope à contraste de phases la morphologie des éléments sanguins périphériques et l'origine des hématies à granulations basophiles chez les lapins et les cobayes soumis à l'intoxication saturnine expérimentale.

Nous avons constaté que :

L'érythrocyte à granulations basophiles peut facilement être identifié des autres altérations de l'érythrocyte (forme épineuse, poikilocytose, restes nucléaires). Sur le fond sombre du disque érythrocytaire apparaît un nombre variable de granulations noires, rondes, irrégulièrement distribuées. Le diamètre et le contour de l'hématie subissent des modifications et l'on observe l'apparition de vacuoles lumineuses sur sa surface. Ces modifications peuvent survenir aussi bien dans les H.G.B. que dans les autres érythrocytes.

Dans les hématies des pigeons, les granulations basophiles sont localisées dans le cytoplasme de l'hématie disposée dans la région périnucléaire.

Dans les hématies des pigeons on constate une diminution de la densité du noyau.

On constate aussi des altérations importantes des cellules de la lignée blanche. On trouve dans le cytoplasme des granulocytes de nombreuses vacuoles, ces granulations sont irrégulières, une partie étant probablement des granulations toxiques.

Le cytoplasme des lymphocytes présente des grandes vacuoles et des granulations

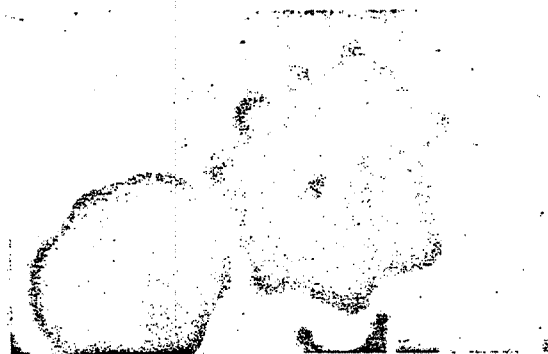


Fig. 1. (Ci-contre.)

Sang normal de lapin, lame non colorée, montée entre lame et lamelle, examinée au microscope à contraste de phase. Microphotographie. Immersion 90. Oc. 10.

A. Globule rouge normal, avec le centre plus brillant.

B. Globule rouge dans lequel on remarque la disposition sur plusieurs plans des épines.

Fig. 2. (Ci-contre.)

Sang normal de lapin (même technique).

Polynucléaire neutrophile. Granulations sensiblement égales en dimensions, réparties uniformément dans le cytoplasme.



Fig. 3. — Sang normal de lapin (même technique).

Lymphocyte avec noyau foncé et cytoplasme clair dans lequel on remarque les granulations de l'appareil mitochondrial.

umis
urine
tech-
utro-
n ob-
s va-
tion
ence
plus
robu-
tions

s nu-
nula-
mbre
réti-
ocyte
ces
s des
issent
modi-
i que
lg. 6).

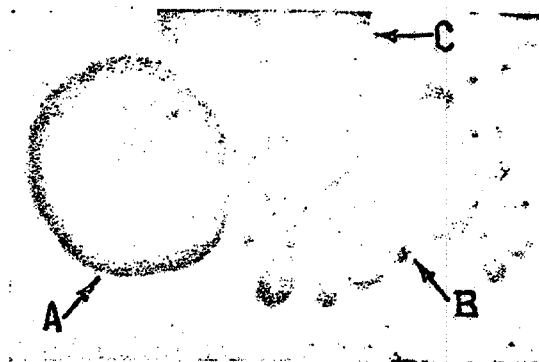


Fig. 4. (Ci-contre.)

Sang de lapin soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).
En opposition avec le globule rouge normal (A) et avec la forme épineuse du globule rouge (B), dans le globule rouge avec des granulations basophiles (C) on constate que ces granulations sont incluses dans le corps du globule rouge, parce qu'elles restent toujours foncées au mouvement de la vis micrométrique.

Fig. 5. (Ci-contre.)

Sang de lapin soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).
Globule rouge avec de nombreuses granulations basophiles et des vucules à diamètre réduit.



Fig. 6. — Sang de lapin soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).
Globule rouge avec de nombreuses vacuoles de taille variable.



Fig. 7. (Ci-contre.)

Sang de lapin soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).

Polynucléaire neutrophile dans lequel on observe de nombreuses vacuoles, la distribution inégale des granulations spécifiques et l'existence de granulations plus grandes, foncées (probablement des granulations toxiques).

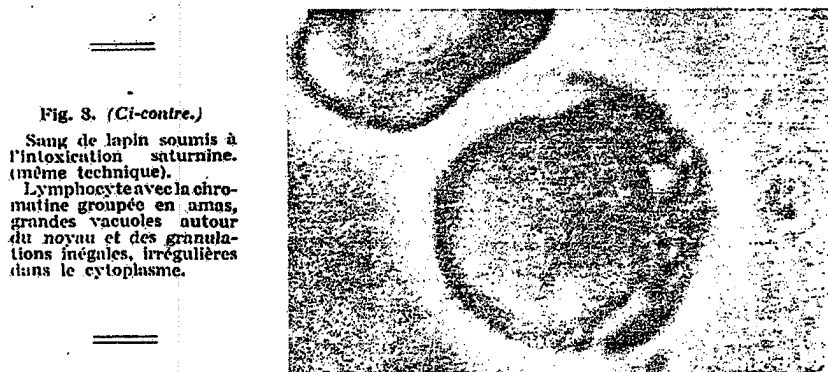


Fig. 8. (Ci-contre.)

Sang de lapin soumis à l'intoxication saturnine. (même technique).

Lymphocyte avec la chromatine groupée en amas, grandes vacuoles autour du noyau et des granulations inégales, irrégulières dans le cytoplasme.

à d'autres altérations des érythrocytes (forme épineuse, poikilocytose, restes nucléaires, etc).

Sur le fond assombri du disque érythrocytaire apparaissent une série de granulations noires, rondes, irrégulièrement distribuées dans l'érythrocyte. Quand le nombre de ces granulations est réduit (5-6) il est difficile de distinguer l'érythrocyte du réticulocyte.

Les petites granulations sont facilement discernées des irrégularités de l'érythrocyte épineux par la manœuvre de la vis micrométrique qui fait constater que ces granulations fines restent toujours sombres (fig. 4) et sont incluses dans le corps des érythrocytes.

Dans un stade plus avancé, ces granulations sont nombreuses (30-40) et remplissent tout l'érythrocyte (fig. 5).

En dehors de l'apparition des granulations, l'érythrocyte supporte d'autres modifications portant sur la dimension du diamètre, l'irrégularité du contour ainsi que l'apparition de vacuoles lumineuses de différentes dimensions sur le fond sombre (fig. 6).



Fig. 9. (Ci-contre.)

Sang de pigeon soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).

Avec l'intensification de l'intoxication saturnine, le contour des hématies devient crénelé et autour du noyau apparaît un halo lumineux.



Fig. 10. (Ci-contre.)

Sang de pigeon soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).

(Globules rouges de pigeon où le nombre des vacuoles intracytoplasmiques croît en accentuant aussi le diamètre, les bords crénelés parfois, avec prolongations épineuses.



Fig. 11. (Ci-contre.)

Sang de pigeon soumis à l'intoxication saturnine expérimentale (même technique).

(Globules rouges de pigeon où abondent les granulations basophiles.

inégales, irrégulières. La chromatine a l'aspect de pelotes assombries, laissant entre elles de larges zones lumineuses.

Les monocytes ont le contour irrégulier. Ils présentent de nombreuses vacuoles. Il résulte que dans les conditions de l'intoxication saturnine expérimentale le microscope à contraste de phases permet d'identifier les H.G.B. sans coloration vitale ou post-vitale.

On constate qu'à côté des H.G.B. il existe dans la série blanche et rouge d'autres altérations importantes.

Le développement des G.B. dans les hématies des pigeons, en respectant en même temps l'intégrité du noyau de l'hématie, plaide en faveur de l'origine cytoplasmique de ces granulations.

(Institut de Médecine de Iassy, Chaire d'Hygiène du Travail. Institut d'Hygiène R.P.R., Filiale de Iassy, Section d'Hygiène du Travail. République Populaire Roumaine.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRODSKI V. I. — *Uspehi sovremenoi biologii*. 1952.
- [2] BESSIS M. — *Revue d'Hématologie*. 4, n° 2 — 1949, 294.
- [3] MOREL P., ROCHE L. et BARON J. — *La Presse Médicale*. n° 55, 1954, p. 1150.
- [4] PREGER O. M. — *Arhiv Patologii*. n° 4, 1951.
- [5] WASSERMANN M., KLEINSTEIN I., IONESCU A. — *Revista de Igiena, Microbiologie si Epidemiologie*. n° 1, 1953, p. 21.
- [6] WASSERMANN L., WASSERMANN M., BUGEA G. — *Sedintele Stiintifice a Institutului de Medicina Iasi*, 1954, iunie 4-6.