

ÉTUDE DE LA CARENCE EXPÉRIMENTALE EN MAGNÉSIUM CHEZ LE VEAU

4. — MISE EN ÉVIDENCE DE PHÉNOMÈNES HÉMOLYTIQUES
ET DE MODIFICATIONS ENZYMATIQUES (GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DÉSHYDROGÉNASE
ET TRANSAMINASE GLUTAMIQUE-OXALACÉTIQUE)

P. LARVOR, T. KWIATKOWSKI ⁽¹⁾ et M. LAMAND

avec la collaboration technique de P. CHAGNAUD et Nicole BERTHELOT

*Institut national de la Recherches agronomique,
Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition,
École nationale vétérinaire, Alfort (Seine)*

SOMMAIRE

Dans un travail antérieur, on a noté la coloration jaune foncé que prend assez souvent le plasma des veaux carencés en magnésium, coloration qui est causée par la présence de bilirubine sous forme libre.

L'origine de ce subictère a été étudiée en comparant la biochimie du plasma chez trois veaux carencés en magnésium et chez deux veaux témoins. On observe chez les carencés une légère anémie, avec augmentation transitoire du fer plasmatique, augmentation de la bilirubine et diminution du taux de glucose-6-phosphate déshydrogénase des globules rouges. Le tissu hépatique n'est pas altéré, mais on note une augmentation de la transaminase glutamique oxalacétique, après les crises de tétanisation musculaire.

L'élévation de la bilirubine doit donc résulter de phénomènes hémolytiques assez discrets, et il semble que ceux-ci soient conditionnés par un déficit de la glucose-6-phosphate déshydrogénase des globules rouges ; il s'agit d'une diminution de la quantité d'enzyme elle-même, à laquelle se superpose peut-être une inactivation par suite de la baisse du magnésium sanguin.

L'élévation de la transaminase glutamique-oxalacétique du plasma après les crises semble résulter de microlésions musculaires dues à la violence des contractions.

INTRODUCTION

En 1939, WISE et *al.* signalaient la coloration jaune foncé que prend parfois transitoirement le plasma des veaux carencés en magnésium. Plus récemment, LARVOR et *al.* (1964) ont pu observer à nouveau ce phénomène et montrer que cette coloration est due à de la bilirubine sous forme libre. Les recherches qui suivent ont été entreprises pour tenter d'éclaircir l'origine de cette bilirubinémie anormale.

⁽¹⁾ Adresse actuelle : Chaire des Maladies internes des Animaux domestiques, Faculté Vétérinaire Wrocław (Pologne).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé cinq veaux de race *Frisonne*, dont trois recevaient un lait semi synthétique pauvre en magnésium (20 mg/l) et deux servaient de témoins et recevaient le même lait complétement en magnésium (190 mg/l). La composition détaillée de ce lait a été indiquée antérieurement (LAVOR et *al.*, 1964). On a dosé chaque semaine dans le plasma sanguin hépariné : le magnésium (méthode de LEWIS, 1960, au jaune de titane), le calcium (photométrie de flamme), le fer (méthode de HENRY et *al.*, 1958, modifiée, à l'orthophénanthroline), l'hémoglobine, la bilirubine totale (méthode de BRUCKNER, 1959) (nous avons en effet vérifié que la totalité de la bilirubine dosable dans le plasma des veaux carencés en magnésium se trouve sous forme de bilirubine libre, anciennement nommée bilirubine indirecte parce qu'elle donne une réaction différée avec le réactif de Van den Bergh), la transaminase glutamique-oxalacétique (TGO) (méthode de REITMAN et FRANKEL, 1957), la glucose-6-phosphate Deshydrogénase des globules rouges (G6PDH) (méthode de KORNBERG et HORECKER, 1955), les résultats de ce dosage sont exprimés en unités par gramme d'hémoglobine, et on a mesuré simultanément l'hématocrite. Au cours de la durée totale de la carence (1 mois 1/2) on a mesuré deux fois la résistance globulaire à l'hémolyse en solution hypotonique et effectué deux numérations de globules rouges.

RÉSULTATS

Observations cliniques et anatomopathologiques.

Elles ont été analogues à celles déjà décrites en détail dans la partie 1 de cette série. Le seul élément nouveau a été l'observation d'un cas caractérisé de calcification rénale chez un animal carencé.

Magnésium plasmatique.

On constate un abaissement régulier chez les carencés, avec remontée au cours des crises de tétanisation.

Hématocrite.

On observe une légère tendance à la baisse chez les carencés, avec une augmentation brutale pendant les crises (déshydratation), l'hématocrite passe alors de 30 p. 100 environ à 37-40 p. 100.

Numération globulaire.

Le tableau 1 récapitule les résultats des numérations globulaires effectuées après 9 semaines de traitement chez les témoins et les carencés, au cours d'une précédente expérience et au cours de ce présent travail. On voit que le nombre moyen de globules rouges a été de 8 720 000 par mm³ chez les témoins et 6 820 000 chez les carencés (F = 10,9 pour 1 et 7 D.L., P < 0,05).

Fer plasmatique.

On observe une augmentation massive du fer plasmatique avant et pendant les crises de tétanisation, avec diminution après la crise jusqu'à des niveaux très faibles (voir un exemple typique, figure 4).

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH).

La G6PDH des globules rouges, rapportée à un gramme d'hémoglobine, était normalement comprise entre 13 et 18 unités/g. Elle diminuait progressivement avant et pendant les crises tétaniques (7 à 12 unités), pour remonter à un niveau normal après celles-ci. La figure 1 montre qu'il y avait une relation positive significative entre le magnésium plasmatique et la G6PDH des globules rouges ($r = +0,512$, $P < 0,01$ pour 45 degrés de liberté).

TABLEAU I

Comparaison du nombre de globules rouges par mm³ de sang chez des veaux témoins et des veaux carencés en magnésium, au cours de deux expériences successives

L'analyse de variance indique, pour l'effet de la carence, une valeur de $F = 10,9$ (analyse à double entrée, correction pour disproportion négligeable) (pour 1 et 7 D.L., $P < 0,05$)

	Témoins	Carencés
1 ^{re} expérience (LARVOR et al., 1964)	8 560 000	6 140 000
	7 710 000	5 950 000
	8 840 000	6 260 000
2 ^e expérience (Présente publication)	9 800 000	6 390 000
	8 700 000	6 870 000
		9 330 000
Moyenne $\pm \sigma$	8 720 000 $\pm 752 000$	6 820 000 $\pm 1 260 000$

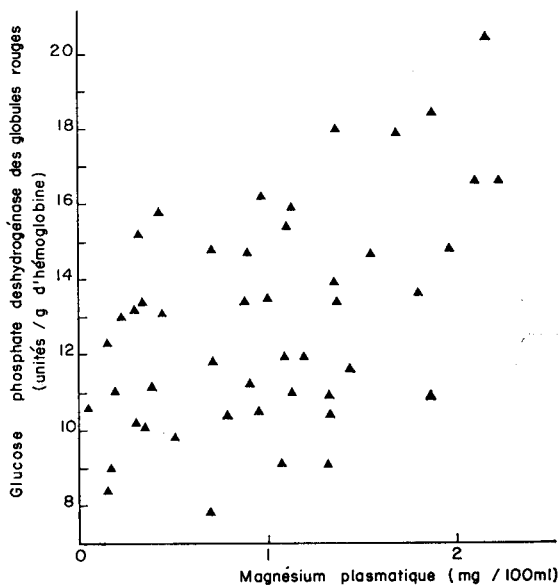


FIG. 1.

Hémoglobine des globules rouges.

La teneur en hémoglobine des globules rouges n'était pas très différente chez les témoins et les carencés (25 à 32 g pour 100 ml de globules). Elle a montré une tendance, non significative, à la baisse au cours des crises de tétanisation.

Résistance globulaire en milieu hypotonique. La résistance globulaire resta normale chez les témoins comme chez les carencés (hémolyse initiale en solution NaCl 0,60 p. 100, hémolyse totale en solution NaCl 0,32 à 0,36 p. 100).

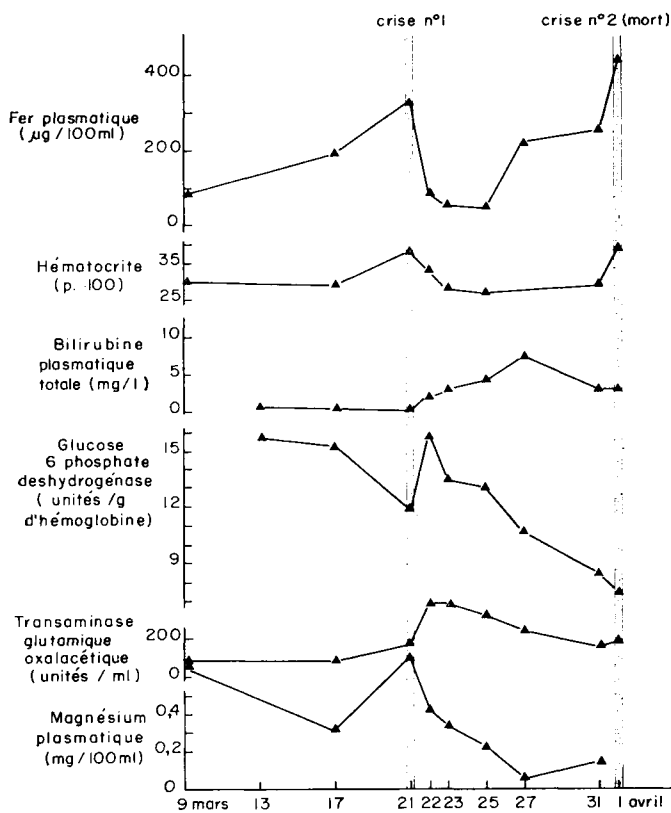


FIG. 2.

Bilirubine totale plasmatique.

Normalement très faible chez le veau de lait (0 à 1 mg par litre de plasma), elle augmente souvent après les crises pour atteindre un niveau maximum modéré, quoique très au-dessus du niveau normal (maximum observé 6 mg par litre). La bilirubine est sous forme libre. L'ictère reste subclinique, les tissus n'étant pas imprégnés par le pigment.

Bilirubine urinaire.

Elle reste toujours très faible, ce qui est une démonstration supplémentaire de la nature indirecte (libre) de la bilirubine plasmatique, en effet, seule la bilirubine conjuguée par le foie (directe), est excrétée par l'urine.

Transaminase glutamique-oxalacétique du plasma (TGO).

Chez les veaux normaux, elle a varié entre 80 et 140 unités REITMAN et FRANKEL tandis que chez les carencés elle augmentait nettement au moment des crises et dans les jours qui suivaient (170 à 360 unités).

Observations histologiques.

L'examen histologique du foie des animaux carencés a montré un aspect normal ou légèrement congestif, sans lésion cellulaire caractérisée.

Les modifications biochimiques que nous venons de décrire dans le plasma ont été en rapport étroit avec la date des crises tétaniques, de plus leur manifestation a eu un degré d'intensité variable avec les sujets, ce qui laisse supposer un important facteur de prédisposition individuelle. Pour ces deux raisons, il est difficile de représenter une évolution moyenne des paramètres, ce qui n'aurait guère de sens. La figure 2 montre donc l'évolution de différents composants sanguins chez l'animal carencé dont la bilirubinémie fut la plus élevée. On a représenté le moment des deux crises de tétanisation (la deuxième fut mortelle), par deux zones en pointillé.

DISCUSSION

1° *Nature de l'ictère.*

On regroupe classiquement les ictères en trois ensembles :

— Ictères par rétention, dans lesquels l'obstruction des voies biliaires provoque le reflux des pigments dans le sang.

— Ictères hépatiques, dans lesquels la cellule hépatique est profondément lésée et excrète mal les pigments.

— Ictères hémolytiques, dans lesquels le foie est débordé par l'afflux de la bilirubine provenant du catabolisme de l'hémoglobine.

Le tableau 2 permet de confronter les observations classiques dans ces trois types d'ictères avec les manifestations que nous avons relevées chez les veaux carencés en magnésium.

L'ensemble des données recueillies permet de conclure que la carence en magnésium chez le veau est susceptible de produire un subictère du groupe hémolytique, souvent transitoire.

La plupart des signes cliniques et biochimiques se trouvent en effet réunis : élévation modérée de la bilirubine, celle-ci étant sous forme libre, pas de bilirubine urinaire, légère anémie, pas de lésion de la cellule hépatique, augmentation considérable mais fugace du fer plasmatique.

La seule note discordante est la présence de taux élevés de transaminase glutamique-oxalacétique, qui signent une lésion cellulaire. Mais cette transaminase n'est manifestement pas d'origine hépatique (histologie normale), et ne peut donc provenir que de microlésions musculaires provoquées par la violence des contractures, et dont on retrouve d'ailleurs la trace à l'autopsie sous forme de pétéchies disséminées dans le parenchyme de certains muscles. Il n'y a cependant pas de dégénérescence musculaire.

2° *Origine des pigments biliaires.*

On peut concevoir deux origines à cette pigmentation : la myoglobine du muscle ou l'hémoglobine des globules rouges. La figure 4 montre que le taux de fer sanguin augmente progressivement bien avant la crise de tétanisation, et ne suit pas du tout le taux de transaminase glutamique-oxalacétique, donc ne paraît pas d'origine musculaire. Il n'est pas exclu qu'un peu de myoglobine puisse sortir du muscle au cours de la crise, mais c'est certainement un facteur mineur dans la production de bilirubine ; de plus on n'observe jamais de myoglobinurie dans ce cas. La bilirubine dérive donc de l'hémoglobine des globules rouges.

TABLEAU 2

Comparaison des manifestations observées dans les trois grands types d'ictères avec nos observations

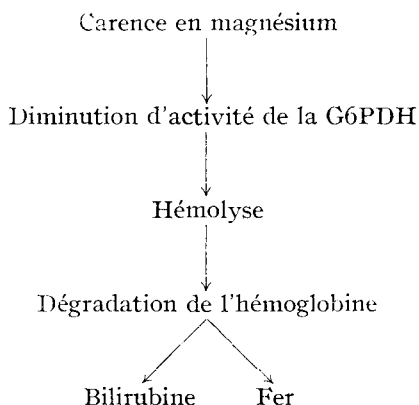
	Importance de la bilirubinémie	Nature de la bilirubine	Histologie du foie	Fer plasmatique	Transaminase glutamique oxalacétique	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	Numération globulaire
Ictère par rétention	forte	conjuguée (directe)	normale	normal	normale	normale	normale
Ictère hépatique	forte	conjuguée (directe)	lésions cellulaires	élevé	élevée	normale	normale
Ictère hémolytique	modérée	libre (indirecte)	normale, parfois congestion, lésions dans les cas très graves	élevé, transitoirement puis faible	normale	parfois augmentée, parfois diminuée (troubles héréditaires)	en général diminuée
Nos observations	modérée	libre (indirecte)	normale	élevé, transitoirement puis faible	élevée	diminuée	diminuée

3° *Mécanisme de l'hémolyse.*

On sait que chez l'homme il a été possible de mettre en évidence une sensibilité particulière à l'hémolyse chez des sujets appartenant aux races méditerranéennes (en Sardaigne par exemple) ou aux races noires (Noirs américains). Une étude approfondie de la biochimie de ces sujets a permis de conclure que cette prédisposition hémolytique (facteur déclenchant : l'ingestion de fèves, de médicaments antipaludéens ou de sulfamides) était liée à un déficit congénital et héréditaire des globules rouges en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (NEWTON et BASS, 1958 ; BEUTLER, 1959 ; SHAHIDI et DIAMOND, 1959). Or la G6PDH est fortement activée par le magnésium (KORNBERG et HORECKER, 1955). L'hypothèse d'un déficit globu-

laire de cette enzyme, conditionné par une carence en magnésium et susceptible d'entraîner des manifestations hémolytiques, pouvait donc être soulevée.

Dans ces conditions, le mécanisme de l'hémolyse pourrait être schématisé comme suit :



On devrait théoriquement observer :

- 1° Une relation directe entre G6PDH et le magnésium plasmatique (considéré comme indicateur de l'intensité de la carence).
- 2° Une relation inverse entre G6PDH des globules et bilirubine du plasma.
- 3° Une relation inverse entre G6PDH des globules et fer plasmatique.

La figure 1 montre l'existence d'une relation directe entre la G6PDH des globules rouges (dosée en présence d'un excès de magnésium) et le taux de magnésium plasmatique des animaux (coefficient de corrélation : $r = + 0,512$, $P < 0,01$).

La figure 3 montre la relation inverse entre la G6PDH des globules et la bilirubine plasmatique ($r = - 0,303$, $P < 0,05$).

La figure 4 montre les valeurs moyennes de la G6PDH des globules lorsqu'on regroupe ces données par classes de niveau de fer plasmatique. On voit qu'il y a des différences significatives, et que notamment la G6PDH des globules est significativement plus faible pour des teneurs en fer élevées du plasma.

On peut donc considérer que l'hypothèse d'une hémolyse par suite d'un déficit d'activité enzymatique de la G6PDH, lui-même consécutif à la carence magnésienne, s'accorde bien aux faits observés.

Par ailleurs, le dosage étant toujours effectué en présence de quantités importantes de magnésium dans le substrat, il faut en déduire que la carence en magnésium entraîne une baisse de la teneur absolue en G6PDH, ce qui ne préjuge évidemment pas de la possibilité d'une inactivation par manque de magnésium.

Pour conclure, il semble donc que la carence profonde en magnésium chez le veau puisse induire un déficit absolu de la glucose-6-phosphate déshydrogénase des globules rouges et peut-être aussi une inactivation de cette enzyme, ce qui entraîne une hémolyse discrète accompagnée d'une anémie légère, d'un subictère à bilirubine libre, et de teneurs en fer élevées dans le plasma. Les contractions musculaires violentes de la crise de téτανisation provoquent des microlésions disséminées avec libération

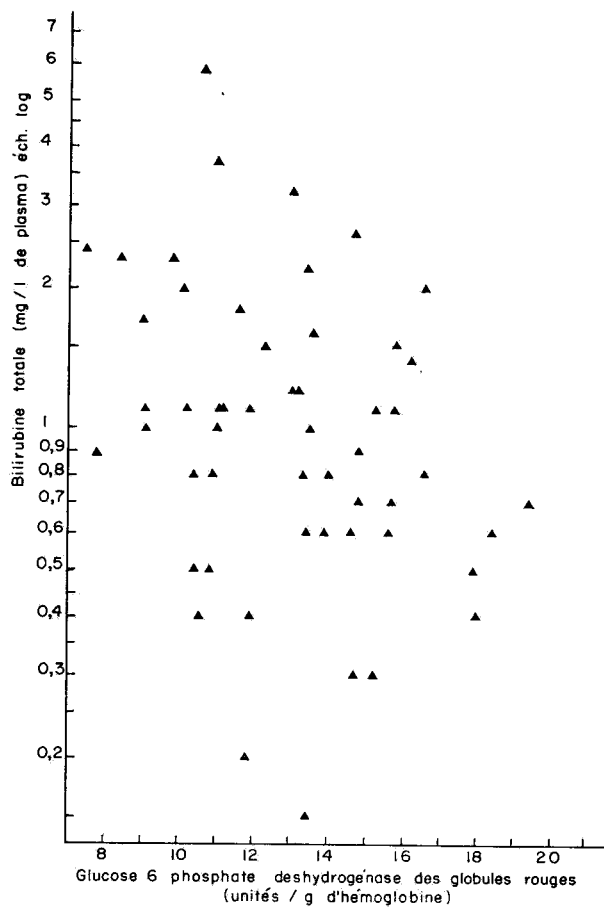


FIG. 3.

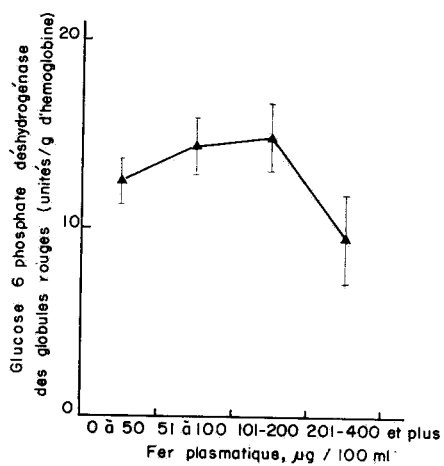


FIG. 4.

de transaminase glutamique-oxalacétique, mais il ne semble pas que la myoglobine susceptible d'être mise en circulation intervienne pour beaucoup dans la formation de l'excès de bilirubine plasmatique.

Reçu pour publication en juin 1965.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. A. PARODI, chef de travaux du Service d'Anatomie pathologique de l'École vétérinaire d'Alfort, qui a bien voulu effectuer l'examen histologique du foie des animaux.

SUMMARY

EXPERIMENTAL MAGNESIUM DEFICIENCY IN THE CALF

4. DEMONSTRATION OF HÆMOLYTIC PHENOMENA AND CHANGES IN ENZYMES

(GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND GLUTAMIC OXALOACETIC TRANSAMINASE)

In an earlier study (LARVOR *et al.*, 1964) it was noticed that blood plasma of calves deficient in magnesium quite often became deep yellow. This fact has also been reported before by WISE *et al.* (1939).

The origin of this sign of icterus was studied in a comparison of the biochemistry of blood plasma of three calves deficient in magnesium and two controls. There was slight anæmia in the deficient calves, 6.82 million red cells per cu.mm against 8.72 million in controls ($P < 0.05$), with an increase of bilirubin and a decrease in the content of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the red cells. Iron increased in plasma, but only transitorily. Liver tissue was not changed, but an increase in glutamic oxaloacetic transaminase was seen after tetanic crises in muscle.

Figure 2 shows for one animal the concomitant changes in these variables during deficiency when there were two tetanic crises, the last of which was fatal.

The following facts :

1. The existence of a direct relation between magnesium in plasma of the calves and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in red cells (figure 1, $r = + 0.512$, $P < 0.01$) ;
2. The existence of an inverse relation between glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cells and bilirubin in plasma (figure 3, $r = - 0.303$, $P < 0.05$) ; and
3. The existence of a significant difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase of cells when plasma is grouped according to iron content (figure 4) ; (the enzyme is significantly less in red cells when iron content of plasma is high).

Show that the increase of bilirubin in plasma of calves deficient of magnesium must result from hæmolytic processes and it seems that they may be conditioned by a shortage of enzymes in the cells. There is a decrease in the amount of glucose-6-phosphate dehydrogenase itself, and to that there may perhaps be added the effect of inactivation from lowering of the magnesium content of the blood.

The increase of glutamic oxaloacetic transaminase in plasma after tetanic crises seems to be due to microlesions in the muscles caused by the violence of the contractions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEUTLER E., 1959. The hemolytic effect of primaquine and related compounds. *Blood*, **14**, 103.
- BRÜCKNER J., 1959. A study of the estimation of low concentration of serum bilirubin. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **52**, 513-520, cité par FAUVERT R. et HARTMANN L., 1962.
- FAUVERT R., HARTMANN L. *Techniques modernes de laboratoire*. 3^e édition, 1 vol., 318 p. L'Expansion éd. Paris, 1962.

- HENRY R. J., SOBEL C., CHIAMORI N., 1958. *Clin. Chim. Acta*, **3**, 323, cité par FAUVERT R. et HARTMANN L. 1962.
- KORNBERG A., HORECKER B. L. Glucose-6-phosphate deshydrogenase. In : COLOWICK S. P., KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*. Vol. I, p. 323-327. Academic Press Ed., New York, 1955.
- LAVOR P., GIRARD A., BROCHARD M., PARODI A., SEVESTRE J., 1954. Étude de la carence expérimentale en magnésium chez le veau. I. Observations cliniques biochimiques et anatomopathologiques. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **4**, 345-369.
- LEWIS W. H. P., 1960. A micro method for the estimation of magnesium. *J. Med. Laboratory technol.* **17**, 32-35.
- NEWTON W. A. jr, BASS J. C., 1958. Glutathione sensitive chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Amer. Med. Ass. J. Dis. Chil.*, **98**, 501-502.
- REITMAN S., FRANKEL S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56, cité par FAUVERT R., et HARTMANN L., 1962.
- SHAHIDI N. T., DIAMOND L. K., 1959. Enzyme deficiency in erythrocytes in congenital non spherocytic hemolytic anemia. *Pediatrics*, **24**, 245-253.
- WISE G. H., PETERSEN W. E., GULLICKSON T. W., 1939. Inadequacy of a whole milk ration for dairy calves as manifested in changes of blood composition and in other physiological disorders. *J. Dairy Sci.*, **22**, 559-572.
-