

Sur les combinaisons de l'hémoglobine avec l'oxygène.

Par

Christian Bohr.

(Communiqué dans la séance du 9 mai 1890.)

Les considérations qui m'ont guidé dans le choix et l'étendue provisoire des recherches que je publie ici sont exposées dans un mémoire précédent: Etudes sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique.

C'est en particulier sur l'existence de différentes modifications de l'oxyhémoglobine que j'ai appelé l'attention. Ces modifications, qui se distinguent en ceci, que la quantité d'oxygène qu'elles fixent est différente pour chacune d'elles, sont décrites dans le chapitre I^{er}; je montre ensuite dans le chapitre II^e que l'hémoglobine cristalline retirée du sang par le procédé habituel est un mélange de différentes substances voisines les unes des autres, et que la quantité d'oxygène qu'elle fixe n'est pas constante.

En ce qui concerne les **méthodes** suivies dans ces recherches, l'absorptiométrie¹⁾ et la préparation de l'hémoglobine²⁾ sont décrites dans les mémoires précédents; il en est de même de l'évacuation³⁾ des solutions d'hémo-

¹⁾ Etudes sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique, p. 174.

²⁾ I. c. p. 175.

³⁾ Sur la teneur en oxygène des cristaux d'hémoglobine, p. 203.

globine. Les analyses de l'air ont été faites en partie par la méthode de Bunsen (absorption de CO_2 par la potasse, détermination de l'oxygène en le faisant détoner avec l'hydrogène) dans l'eudiomètre, en partie par celle de Petterson¹⁾, où l'acide carbonique est absorbé par la potasse et l'oxygène par l'hyposulfite de soude. J'ai modifié légèrement l'appareil de Petterson, pour qu'une plus petite quantité d'air provenant de l'évacuation pût facilement passer de l'eudiomètre dans le tube gradué et être analysé. Les deux méthodes ont donné des résultats également exacts.

Les analyses spectrales quantitatives ont en partie été faites à l'aide de l'appareil de Glan, où, comme on sait, l'intensité de la lumière se mesure en tournant un prisme de Nicol; dans ces déterminations, j'ai observé toutes les précautions indiquées par M. Torup²⁾, au mémoire duquel je me réfère. Cet appareil donne des déterminations très exactes, mais il est d'un emploi un peu difficile. C'est pourquoi je me suis servi pour une partie des déterminations de l'appareil de MM. Vierordt-Krüss, où l'on mesure l'intensité de la lumière par un rétrécissement symétrique de la moitié de la fente. L'instrument est d'un maniement facile et donne de bons résultats lorsque, par une dilution convenable des solutions examinées, on a soin de ne pas employer un rétrécissement trop fort de la fente. Comme les déterminations données par ces deux appareils ne sont pas directement comparables entre elles, on a, dans ce qui suit, désigné les déterminations par Sp. Gl. ou Sp. V—K., suivant qu'elles ont été faites avec l'appareil de Glan ou celui de Vierordt-Krüss.

Le fer a, comme à l'ordinaire, été déterminé par cinéfaction, réduction avec le zinc et titrage avec l'hypermanganate

¹⁾ Ber. d. deutschen chemischen Ges. 1889, p. 3324.

²⁾ Blodets Kulsyrebinding, p. 70.

de potasse. En fait de détails techniques, nous rappellerons seulement que le zinc pur du commerce n'est pas complètement exempt de fer. C'est pour-quoi on a déterminé la teneur en fer du zinc servant à la réduction, de même que le zinc employé pour chaque réduction a toujours été pesé.

Les poids moléculaires ont été déterminés par la dépression du point de congélation des solutions employées, d'après la méthode de M. Raoult. Comme la constante qui entre dans le calcul des poids moléculaires et qui peut varier pour les différents groupes chimiques, n'est pas connue pour l'hémoglobine, le nombre donné dans ce qui suit pour le poids moléculaire (il est désigné par M) est seulement relatif; il a été obtenu en prenant arbitrairement la constante 100.

Chapitre I.

L'hémoglobine retirée du sang par la méthode ordinaire absorbe, à la pression de l'oxygène dans l'atmosphère (près de 150 mm.) environ 1,5 cent. cub. d'oxygène par gramme. Mais on rencontre quelquefois des oxyhémoglobines qui, sans qu'elles paraissent différer d'une manière évidente de l'hémoglobine ordinaire lorsqu'on les traite par les méthodes générales d'analyse (analyse spectrale), renferment cependant une quantité d'oxygène dissociable autre que la précédente. On trouve ainsi que les quantités d'oxygène en combinaison lâche peuvent, à la pression ci-dessus, être d'environ 3, 0,75 ou 0,4 cent. cub. par gramme. Nous désignons ces différentes oxyhémoglobines par des lettres grecques, en appelant celle qui ne contient que 0,4 cent. cub. d'oxygène par gramme oxyhémoglobine α , et les autres oxyhémoglobines β , γ , δ , suivant leur teneur croissante en oxygène.

Comme toutes ces oxyhémoglobines ont beaucoup de caractères communs, il n'est pas impossible que les oxyhémoglobines β et γ (l'espèce ordinaire), qui relativement aux quantités d'oxygène absorbées, sont intermédiaires entre les oxyhémoglobines α et δ , soient des mélanges de ces deux dernières. Toutefois, mes recherches ne sont pas assez étendues pour éclaircir cette question; il me reste notamment encore à faire l'analyse spectrale quantitative des hémoglobines δ et α . Nous regarderons donc les oxyhémoglobines ci-dessus mentionnées comme quatre modifications différentes, et commencerons par décrire la combinaison γ comme étant celle sur laquelle on possède le plus grand nombre d'observations.

Oxyhémoglobine γ . On la retire du sang par le procédé décrit en détail dans un mémoire précédent, et qui, dans ses traits principaux, consiste en un lavage des globules du sang dans l'appareil centrifuge, suivi d'une addition d'éther. La seconde cristallisation est produite par le refroidissement de la solution concentrée avec ou sans addition d'alcool. La quantité d'oxygène qu'elle peut absorber par gramme à la pression de l'oxygène de l'atmosphère et à la température du laboratoire, a fait l'objet de plusieurs recherches, dont les plus nombreuses sont celles de M. Hüfner¹⁾, qui trouve pour cette absorption environ 1,5 cent. cub. par gramme. Au reste, les différents auteurs qui se sont occupés de cette question sont arrivés à des résultats en général peu concordants. Les causes de ce désaccord, comme des indications tout aussi peu concordantes qu'on trouve dans la littérature sur la teneur en fer de l'hémoglobine, sont exposées dans le chapitre II^e, où je décrirai également les expériences sur l'absorption spectrale et le poids moléculaire de l'hémoglobine γ qui ne m'ont pas donné des nombres constants.

¹⁾ Ztsch. f. physiol. Chemie, I, 1878.

En revanche, il règne un accord complet entre les différents auteurs en ce qui concerne la situation des bandes d'absorption très marquées entre *D* et *E*. Le milieu de la 1^{re} bande est situé dans la région du spectre où la longueur d'onde $\lambda = 5575$, et le milieu de la 2^e dans celle où $\lambda = 5395$.

C'est donc sur ce spectre d'absorption et sur la fixation d'environ 1,5 cent. cub. d'oxygène par gramme, que nous devons provisoirement baser notre définition de l'oxyhémoglobine γ .

La dissociation de cette oxyhémoglobine à la température ordinaire a été étudiée avec beaucoup de soin. MM. Holmgren¹⁾ et Worm Müller²⁾, en opérant, le premier, sur le sang, et le second, en outre, sur des solutions d'hémoglobine, ont fourni des renseignements importants sur le rapport entre la pression de l'oxygène et la quantité de ce gaz fixée en combinaison lâche. La courbe de dissociation, c'est-à-dire celle qui a pour abscisses les pressions de l'oxygène et pour ordonnées les quantités d'oxygène absorbées, a été déterminée en entier par P. Bert³⁾, pour ce qui regarde le sang. En ce qui concerne l'oxyhémoglobine, j'ai, dans une série de recherches⁴⁾, examiné en détail les questions qui s'y rattachent. Ces recherches ayant été publiées dans un ouvrage peu répandu, je citerai ici mes expériences. Les résultats sont obtenus par la méthode absorptiométrique. Les volumes gazeux ont ici, comme partout dans le mémoire, été mesurés à 0° et 760 mm. Les expériences sont marquées de chiffres romains; *p* désigne la pression de l'oxygène en millimètres, *v* le volume en centimètres cubes de l'oxygène absorbé par gramme d'hémoglobine à la pression correspondante, *t* la température.

¹⁾ Sitzgsber. d. Wiener Acad. 1863.

²⁾ Ber. d. sächs. Ges. d. Wiss. 1870.

³⁾ Pression barométrique. Paris 1878.

⁴⁾ Exp. Untersuch. über Blutfarbestoff. Copenhagen 1885.

I. Solution à 3,83 %.

$$p = 485,9 \quad v = 1,54 \quad t = 15^{\circ},7$$

II. Solution à 3,74 %.

$$p = 204,4 \quad v = 1,46 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 111,4 \quad v = 1,41 \quad t = 14^{\circ},8$$

$$p = 63,0 \quad v = 1,38 \quad t = 14^{\circ},8$$

$$p = 36,3 \quad v = 1,35 \quad t = 14^{\circ},8$$

III. Solution à 3,59 %.

$$p = 35,9 \quad v = 1,37 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 21,9 \quad v = 1,36 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 13,4 \quad v = 1,20 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 9,3 \quad v = 1,08 \quad t = 15^{\circ},1$$

$$p = 6,3 \quad v = 1,01 \quad t = 15^{\circ},1$$

IV. Solution à 1,75 %.

$$p = 379,8 \quad v = 1,60 \quad t = 11^{\circ},5$$

$$p = 388,4 \quad v = 1,55 \quad t = 20^{\circ},4$$

V. Solution à 1,96 %.

$$p = 461,7 \quad v = 1,56 \quad t = 15^{\circ},2$$

VI. Solution à 1,94 %.

$$p = 339,0 \quad v = 1,54 \quad t = 15^{\circ},6$$

VII. Solution à 1,88 %.

$$p = 308,2 \quad v = 1,56 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 157,5 \quad v = 1,52 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 12,2 \quad v = 1,26 \quad t = 15^{\circ},0$$

$$p = 7,6 \quad v = 1,17 \quad t = 15^{\circ},1$$

$$p = 2,0 \quad v = 0,53 \quad t = 15^{\circ},0$$

VIII. Solution à 1,80 %.

$$p = 138,5 \quad v = 1,52 \quad t = 15^{\circ},3$$

$$p = 23,1 \quad v = 1,35 \quad t = 15^{\circ},4$$

$$p = 12,8 \quad v = 1,25 \quad t = 15^{\circ},4$$

$$p = 6,2 \quad v = 1,15 \quad t = 15^{\circ},4$$

$$p = 1,5 \quad v = 0,50 \quad t = 15^{\circ},2$$

IX. Solution à 0,87 ‰.

| | | |
|-------------|------------|--------------------|
| $p = 270,5$ | $v = 1,69$ | $t = 14^{\circ},8$ |
| $p = 133,4$ | $v = 1,55$ | $t = 15^{\circ},1$ |

X. Solution à 0,89 ‰.

| | | |
|-----------|------------|--------------------|
| $p = 2,6$ | $v = 0,73$ | $t = 14^{\circ},6$ |
| $p = 2,0$ | $v = 0,55$ | $t = 14^{\circ},9$ |

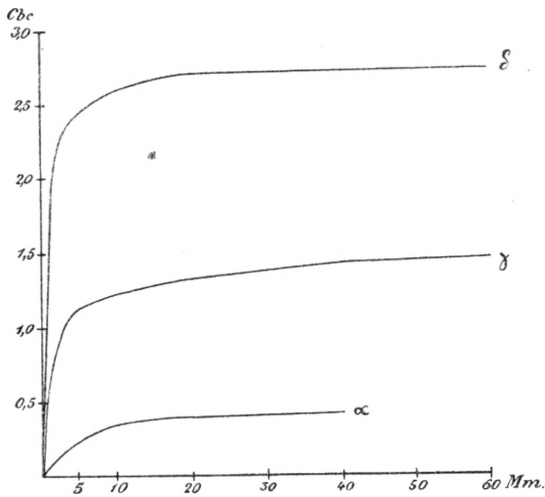
XI. Solution à 0,90 ‰.

| | | |
|-------------|------------|--------------------|
| $p = 298,8$ | $v = 1,70$ | $t = 15^{\circ},4$ |
| $p = 11,4$ | $v = 1,07$ | $t = 14^{\circ},6$ |
| $p = 8,7$ | $v = 1,02$ | $t = 14^{\circ},7$ |
| $p = 2,3$ | $v = 0,60$ | $t = 14^{\circ},4$ |

Les quantités d'oxygène qui, dans ces expériences, sont indiquées comme ayant été absorbées par l'hémoglobine, ont été obtenues en soustrayant de l'absorption totale, réellement observée dans les solutions d'hémoglobine, la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau proportionnellement à la pression. Le coefficient d'absorption est plus faible pour les solutions d'hémoglobine que pour l'eau (Exp. Untersuch. p. 37); il varie pour les solutions d'hémoglobine avec le degré de concentration de la solution, et il faudrait par conséquent, dans le calcul des expériences, retrancher une quantité moindre d'oxygène dissous lorsque la concentration a été plus forte. Mais faute de renseignements suffisants sur cette question, j'ai employé partout le même coefficient d'absorption. Cela n'a aucune importance pour les faibles pressions, vu la petitesse de la valeur absolue du coefficient d'absorption de l'oxygène, et, par la même raison, on peut regarder comme presque négligeable l'erreur qui résulte, dans la forme de la courbe, de l'emploi d'un coefficient d'absorption non complètement exact (voir les Etudes sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique, p. 185).

Les résultats qui découlent des expériences ci-dessus mentionnées sur la dissociation de l'hémoglobine à 15° , peuvent se résumer dans les trois propositions suivantes:

1. La courbe qui exprime la relation entre les pressions de l'oxygène et les quantités d'oxygène absorbées, est une courbe régulière, de la forme représentée dans la courbe marquée γ (voir la figure), et dont la plus forte courbure correspond à une pression voisine de 10 mm.; conformément à cette dernière indication, MM. Holmgren et Worm-Müller ont trouvé, respectivement pour le sang et l'oxyhémoglobine, que l'hémoglobine ne dégageait beaucoup d'oxygène



que lorsque la pression tombait au-dessous de 20 mm. Mais, comme l'a montré P. Bert¹⁾ dans ses expériences sur l'absorption de l'oxygène par le sang en dehors de l'organisme, cela ne signifie nullement qu'il se produise ici dans la courbe un brusque abaissement qui puisse être interprété comme le lieu d'une limite de la dissociation. Il n'était en effet pas douteux, d'après les recherches de cet auteur, que la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine ne fût aussi une courbe

¹⁾ l. c. p. 687.

régulière qui tourne sa concavité vers l'axe des abscisses. La preuve formelle en est fournie par les expériences décrites plus haut, où le contour de la courbe est fixé avec une précision plus grande que ne le permettait la méthode employée par P. Bert.

2. Mes expériences montrent que l'oxyhémoglobine n'est pas saturée d'oxygène même sous les pressions les plus fortes auxquelles on a opéré. La courbe de dissociation va toujours en montant avec des pressions croissantes, quoique très lentement en dernier lieu, et semble se rapprocher d'une limite de saturation comme d'une asymptote. C'est aussi ce que nous avons, dans un mémoire précédent, constaté pour la carbo-hémoglobine. Ce résultat, tant en ce qui concerne l'oxyhémoglobine que la carbo-hémoglobine, est rendu évident par la circonstance que la totalité des gaz absorbés dans une solution d'hémoglobine ne suit pas la loi de Henry, même aux pressions les plus fortes (voir pour plus de détails mes Etudes sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique, p. 185).

D'après P. Bert¹⁾, le sang, à la pression d'une atmosphère, est saturé d'oxygène dissociable, et son absorption d'oxygène au delà de cette pression est une fonction linéaire de la pression. Ce résultat doit être considéré comme un à peu près, car les expériences dans lesquelles la pression a été poussée jusqu'à 18 atmosphères, ne peuvent être tout à fait exactes, la loi de Mariotte n'étant plus exacte à des pressions si élevées, ce qui influe sur le calcul du gaz absorbé. En comparant les différentes expériences mentionnées par P. Bert dans l'ouvrage cité, on trouve aussi que les quantités d'oxygène qui, d'après la loi de Henry, devraient être absorbées par 100 cent. cub. de sang à la pression de 1 atmosphère, varient de 0,3 à 1,12 cent. cub.

3. La concentration exerce une influence sur la courbe de dissociation, en ce sens que, pour la même pression, l'absorption de l'oxygène est d'autant plus petite qu'elle est elle-même plus grande. La limite de saturation est donc plus basse pour une plus forte que pour une moins forte concen-

¹⁾ I. c. p. 697.

tration, comme le fait voir une comparaison entre les expériences faites avec des solutions à 4, 2 et 1 0/0. Les courbes de dissociation des solutions à 1 0/0, à cause de la petite quantité d'hémoglobine que ces dernières contiennent, ne sont pas aussi régulières que celles des solutions plus concentrées, dont les résultats, obtenus par une interpolation graphique de toutes les expériences faites avec des solutions à 4 et à 2 0/0, sont consignés dans le tableau suivant

| Pression de l'oxygène en millim. | Oxygène absorbé par gr. de <i>Hgb</i> dans des solutions à 4 0/0 en cent. cub. | Oxygène absorbé par gr. de <i>Hgb</i> dans des solutions à 2 0/0 en cent. cub. |
|----------------------------------|--|--|
| 5 | 0,98 | 1,14 |
| 10 | 1,12 | 1,23 |
| 20 | 1,24 | 1,32 |
| 40 | 1,37 | 1,44 |
| 60 | 1,42 | 1,48 |
| 150 | 1,44 | 1,53 |

Les expériences mentionnées jusqu'ici ont été exécutées à la température de 15° environ. Comme le montreront les remarques suivantes, la dissociation de l'oxyhémoglobine n'a été que peu étudiée à la température du corps. Nous ne pouvons surtout dire avec certitude si, à des pressions élevées de l'oxygène, l'hémoglobine absorbe moins de ce gaz à la température du corps qu'à 15°, ni, par conséquent, si, comme c'est le cas avec la carbo-hémoglobine, la limite de saturation s'abaisse quand la température croît. Les expériences qui suivent semblent parler en faveur de cette dernière hypothèse, mais elles n'ont pas été faites à des pressions assez élevées.

Une solution d'hémoglobine à 4,19 0/0 a absorbé par gramme de *Hgb* (défalcation faite de l'air dissous dans l'eau)

à 15°,6 1,123 cent. cub. d'oxygène

à 39°,6 0,968 id. id.

respectivement sous une pression d'oxygène de 51,4 et de 56,8 mm.

Je n'ai fait aucune expérience sur la marche de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine à la température du corps. Pour ce qui regarde le sang, on en trouve chez P. Bert¹⁾ plusieurs d'où il résulte avec évidence que cette courbe de dissociation est régulière comme les autres courbes de dissociation de l'hémoglobine, et tourne sa concavité vers l'axe des abscisses. Par contre, les expériences de P. Bert ne font pas connaître la forme exacte de la courbe et, notamment, ne permettent pas de déterminer si le lieu de la plus forte courbure dans les courbes obtenues à la température du corps et à 15°, correspond à une pression différente de l'oxygène, ou si les deux courbes se comportent de la même manière à cet égard, et ne diffèrent que par la situation de la limite de saturation, comme c'est le cas pour la carbo-hémoglobine (voir Bohr: Etudes sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique, p. 186).

P. Bert a certainement pensé que ses expériences lui permettraient de résoudre la question dont il s'agit. Mais il se trouve que l'un des points qui influent le plus sur la forme de la courbe correspondant à la température du corps (voir P. Bert, l. c. p. 691), à savoir celui qui correspond à une pression d'oxygène de 38 mm. (190 mm. de pression atmosphérique) est une moyenne de deux valeurs qui sont si distantes l'une de l'autre que la situation du point en devient tout à fait incertaine. Ces deux valeurs se trouvent dans les expériences CCVIII et CCIX, p. 695, et sont respectivement 16,5 et 11,6 cent. cub., l'oxygène contenu dans 100 cent. cub. de sang à la pression atmosphérique mesurant 20 cent. cub.

¹⁾ P. Bert, La pression barométrique. Paris 1878, p. 687 et suivantes.

Oxyhémoglobine δ . On rencontre quelquefois une solution d'hémoglobine qui, par gramme de cette substance, absorbe environ deux fois plus d'oxygène que l'oxyhémoglobine γ . Je n'ai jusqu'ici pas réussi à produire à volonté cette oxyhémoglobine δ ; on la trouve parfois dans des solutions à 1% conservées pendant quelque temps dans des ballons fermés à la lampe; des solutions plus concentrées de la même hémoglobine conservées dans les mêmes conditions ne présentent pas cette particularité. Il semble que, dans les expériences de M. Jolin¹⁾ sur l'hémoglobine du cobaye, il s'est produit une combinaison analogue après une action prolongée de l'oxygène sur une solution à 1%; dans ce cas, l'oxyhémoglobine et la carbo-hémoglobine du cobaye se prêteraient plus facilement que celles du chien à diverses modifications. Les bandes de son spectre ont exactement la même situation que celles de l'oxyhémoglobine γ . L'absorption de la lumière n'a pas été déterminée quantitativement.

La courbe de dissociation a été déterminée par les 2 expériences qui suivent. Les lettres ont la même signification que dans les expériences décrites plus haut.

Expérience I. Solution à 0,892 %.

| | | |
|------------|------------|--------------------|
| $p = 13,1$ | $v = 2,75$ | $t = 14^{\circ},8$ |
| $p = 7,6$ | $v = 2,73$ | $t = 15^{\circ},1$ |
| $p = 4,9$ | $v = 2,62$ | $t = 15^{\circ},2$ |
| $p = 3,0$ | $v = 2,48$ | $t = 15^{\circ},2$ |

Expérience II. Solution à 0,921 %.

| | | |
|-------------|------------|--------------------|
| $p = 531,1$ | $v = 3,04$ | $t = 15^{\circ},3$ |
| $p = 392,3$ | $v = 2,70$ | $t = 15^{\circ},3$ |
| $p = 245,6$ | $v = 2,74$ | $t = 15^{\circ},4$ |
| $p = 125,6$ | $v = 2,62$ | $t = 15^{\circ},3$ |
| $p = 67,7$ | $v = 2,49$ | $t = 15^{\circ},5$ |

¹⁾ Jolin, Archiv f. Anat. et Physiologie, 1889, p. 284.

| | | |
|------------|------------|--------------------|
| $p = 37,4$ | $v = 2,47$ | $t = 14^{\circ},8$ |
| $p = 21,1$ | $v = 2,55$ | $t = 14^{\circ},9$ |
| $p = 9,2$ | $v = 2,52$ | $t = 15^{\circ},0$ |
| $p = 4,7$ | $v = 2,29$ | $t = 15^{\circ},1$ |

Avec ces valeurs on obtient, par un interpolation graphique, une courbe de dissociation, marquée δ , de la forme représentée dans la figure p. 215. Par suite de la faible concentration des solutions, l'accord entre les différentes déterminations n'est pas aussi grand que pour l'oxyhémoglobine γ , mais il est cependant suffisant pour assurer la situation à peu près exacte de la courbe. Le tableau suivant donne les quantités d'oxygène absorbées par l'oxyhémoglobine δ aux différentes pressions de ce gaz.

| Pression de l'oxygène en millim. | Oxygène absorbé par gramme de <i>Hgb</i> en cent. cub. |
|--|--|
| 5 | 2,45 |
| 10 | 2,60 |
| 20 | 2,68 |
| 40 | 2,69 |
| 60 | 2,70 |
| 150 | 2,80 |

Oxyhémoglobine β . Si l'on sèche les cristaux d'oxyhémoglobine suivant la méthode indiquée dans le mémoire précédent, et qu'on fasse dissoudre dans l'eau la poudre sèche, la solution (oxyhémoglobine β), qui d'ailleurs a le même spectre d'absorption que l'oxyhémoglobine ordinaire, absorbe dans les mêmes conditions moins d'oxygène que cette dernière.

Pour étudier de plus près cette réaction, j'ai, tant dans une solution d'oxyhémoglobine ordinaire (γ) que dans celle de la modification β , provenant des mêmes cristaux séchés et

redissous, déterminé le résidu, la teneur en fer, le poids moléculaire relatif, l'absorption de l'oxygène, et entrepris la mesure de la situation des bandes d'absorption de même que la détermination du « rapport d'absorption » de la lumière. Dans ces expériences, qui sont exposées ci-après, on a procédé comme il suit; quand le moment était venu de déterminer la quantité d'oxygène absorbée par les solutions d'hémoglobine, on les secouait d'abord avec de l'air atmosphérique à l'état de pureté, après quoi on les évacuait et retranchait du volume des gaz obtenus la partie qui pouvait avoir été dissoute dans l'eau, correction qui du reste ne joue ici qu'un faible rôle. Quant à la détermination de l'absorption spectrale (α_r), en désignant par ε le coefficient d'extinction mesuré avec le spectro-photomètre, et par c la concentration de la solution d'hémoglobine (le poids de cette dernière dans 100 cent. cub. de liquide), on a, comme on sait:

$$c = \alpha_r \varepsilon.$$

$\alpha_r = \frac{c}{\varepsilon}$ a une valeur constante dans l'hypothèse que l'absorption de lumière produite par divers échantillons d'hémoglobine dans une région déterminée du spectre est identique. Cette hypothèse ne s'étant pas réalisée, je me suis servi des variations de α_r comme mesure des différences dans l'absorption spectrale des différentes espèces d'hémoglobine; α_r est alors proportionnel à la quantité d'hémoglobine (résidu de la solution d'hémoglobine) correspondant à une unité d'absorption de lumière.

On peut maintenant, d'une manière analogue, calculer les quantités d'oxygène et de fer correspondant à une unité d'absorption de lumière, car en désignant respectivement par O et Fe les quantités de ces deux corps contenues dans 100 cent. cub. de liquide, on a:

$$O = a_{ox} \varepsilon \quad \text{et} \quad Fe = a_{fe} \varepsilon$$

$a_{ox} = \frac{O}{\varepsilon}$ et $a_{fe} = \frac{Fe}{\varepsilon}$, conjointement avec α_r , nous donnent

un aperçu des rapports entre l'absorption de la lumière et les quantités d'oxygène, de fer et de résidu dans les solutions des différentes espèces d'hémoglobine. Les points du spectre où l'absorption a été mesurée sont désignés dans le tableau ci-dessous par leur longueur d'onde (λ), et par Vol. $\%$, il faut comprendre le nombre de grammes de substance contenus dans 100 cent. cub. de la solution. Les gaz sont mesurés à 0° et à 760 mm.

Expérience I.

Avec les cristaux humides et secs on a fait des solutions dont l'analyse a donné les résultats consignés dans le tableau ci-dessous. La poudre sèche, avant d'être dissoute, renfermait 15 $\%$ d'eau et 0,39 $\%$ de fer.

| | Solution de cristaux humides. Oxyhémoglobine γ . | Solution de cristaux secs. Oxyhémoglobine β . |
|---|---|---|
| Vol. $\%$ de résidu | 14,47 | 7,30 |
| Oxygène par 100 gr. de résidu . | 130,2 | 54,5 |
| Vol. $\%$ de fer | 0,06674 | 0,03329 |
| $\%$ de fer dans le résidu | 0,461 | 0,456 |
| Oxygène par gr. de fer | 282,3 | 119,6 |
| Poids moléculaire | 15220 | 14600 |
| Milieu de la 1 ^{re} bande d'absorption | $\lambda = 577$ | $\lambda = 577$ |
| Milieu de la 2 ^e bande d'absorption | $\lambda = 540$ | $\lambda = 540$ |
| α_r ($\lambda = 545$) | 0,1017 | 0,2019 |
| α_r ($\lambda = 538$) | 0,1316 | 0,1867 |
| α_{ox} ($\lambda = 545$) | 0,1325 | 0,1101 |
| α_{fe} ($\lambda = 545$) | 0,000469 | 0,000921 |

Expérience II.

La poudre sèche renfermait 15,8 $\%$ d'eau et 0,376 $\%$ de

fer. Les déterminations faites respectivement dans une solution de cristaux secs et humides ont donné :

| | Solution de cristaux humides. Oxyhémoglobine γ . | Solution de cristaux secs. Oxyhémoglobine β . |
|---|---|---|
| Vol. $\%$ de résidu | 13,22 | 5,56 |
| Oxygène par 100 gr. de résidu . | 131,2 | 78,25 |
| Vol. $\%$ de fer | 0,05321 | 0,02659 |
| $\%$ de fer dans le résidu sec . . | 0,403 | 0,480 |
| Oxygène par gr. de fer | 325,9 | 163,7 |
| Poids moléculaire relatif | 5740 | 7120 |
| α_r ($\lambda = 599$) | 0,2159 | 0,1885 |
| α_r ($\lambda = 578$) | 0,08395 | 0,09774 |
| α_r ($\lambda = 545$) | 0,09025 | 0,09667 |
| α_r ($\lambda = 543$) | 0,09403 | 0,1004 |
| α_{ox} ($\lambda = 545$) | 0,1184 | 0,0756 |
| α_{fe} ($\lambda = 545$) | 0,003632 | 0,004622 |

L'analyse spectrale, dans les expériences qui précèdent, a été effectuée avec l'appareil de Vierordt-Krüss. Je donnerai encore les résultats de deux expériences faites avec le spectrophotomètre de Glan, et qui ne portent que sur l'absorption spectrale de deux solutions d'oxyhémoglobine β . Les valeurs données pour l'absorption spectrale de l'oxyhémoglobine γ sont empruntées aux recherches que M. Torup¹⁾ a faites avec l'appareil de Glan.

Expérience III.

| | Oxyhémoglobine γ . | Oxyhémoglobine β . |
|--|---------------------------|--------------------------|
| α_r ($\lambda = 563$) | 0,2022 | 0,3744 |
| α_r ($\lambda = 544$) | 0,1275 | 0,3162 |

¹⁾ Torup, Blodets Kulsyrebinding. Kjøbenhavn 1887, p. 98

Expérience IV.

| | Oxyhémoglobine γ . | Oxyhémoglobine β . |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| a_r ($\lambda = 544$) | 0,1275 | 0,2554 |

Dans les expériences I et II, l'oxyhémoglobine β a absorbé en moyenne 0,7 cent. cub. d'oxygène, tandis que l'oxyhémoglobine γ en a fixé 1,3 cent. cub.

Cette dernière a aussi, par gramme de fer, absorbé environ deux fois plus d'oxygène que l'oxyhémoglobine β (dans l'expérience I, les quantités d'oxygène absorbées par gramme de fer sont entre elles comme 2,4 : 1, et, dans l'expérience II, comme 2 : 1).

La teneur en fer de l'oxyhémoglobine β est élevée, même si elle ne l'est pas dans l'oxyhémoglobine γ correspondante (expérience II; pour les variations de la teneur en fer de l'oxyhémoglobine γ , voir le chapitre suivant).

Le poids moléculaire, dans l'expérience I, s'est maintenu constant en passant de l'oxyhémoglobine γ à la modification β ; dans l'expérience II, on trouve pour cette dernière un poids moléculaire un peu plus élevé, mais étant donné les solutions relativement faibles qu'on a dû employer, cette différence n'est pas assez grande pour qu'on puisse y attacher quelque importance.

L'analyse spectrale montre que la différence dans l'absorption de lumière qu'on constate dans les différentes régions du spectre est relativement moindre pour l'oxyhémoglobine β que pour la modification γ ; on voit de plus que a_r est toujours plus grand pour la première que pour la seconde, ce qui revient à dire que l'oxyhémoglobine β , à conditions égales, absorbe moins de lumière que l'oxyhémoglobine γ . Dans plusieurs cas, a_r a augmenté en raison inverse de l'absorption d'oxygène (environ comme 1 : 2); une détermination

de la lumière absorbée et de la quantité d'oxygène ne nous révélerait pas ici le grand changement que l'hémoglobine subit cependant en réalité. Dans l'expérience II, α_r , bien que plus grand pour l'oxyhémoglobine β que pour la modification γ , ne l'est pas au même degré que le volume d'oxygène absorbé est plus faible; cette expérience nous oblige donc à abandonner l'idée que les autres expériences semblent suggérer, à savoir qu'il existe une relation bien déterminée entre l'oxygène fixé et la lumière absorbée.

Je rappellerai enfin que, dans un mémoire précédent (Sur les combinaisons du sang avec l'acide carbonique, p. 193), j'ai montré que, sous l'action simultanée de l'oxygène et de l'acide carbonique sur l'hémoglobine, il se forme souvent de l'oxyhémoglobine β ; conformément à ce résultat, MM. Brouardel et Loye (Compt. rend. d. l. Soc. biologique, 1885) ont trouvé que la capacité respiratoire du sang peut être réduite de moitié, lorsqu'on le soumet pendant plusieurs heures à l'action de l'acide carbonique.

Oxyhémoglobine α . Dans un mémoire précédent¹⁾, nous avons montré que les cristaux d'hémoglobine séchés absorbent par gramme 0,36 cent. cub. d'oxygène. Nous avons en même temps fait observer qu'il en résultait une possibilité en faveur de l'existence d'une espèce particulière d'oxyhémoglobine avec cette faible teneur en oxygène. Or, cette modification (oxyhémoglobine α) existe bien réellement, car en procédant comme il suit, on peut préparer une hémoglobine qui, dissoute dans l'eau, n'absorbe environ que 0,4 cent. cub. d'oxygène par gramme.

On obtient en effet cette modification en secouant avec de l'air atmosphérique, après l'avoir évacuée, une solution d'oxyhémoglobine β . Le spectre, en ce qui concerne la situation des bandes d'absorption, est le même que ceux des oxy-

¹⁾ Bohr et Torup, Sur la teneur en oxygène des cristaux d'oxyhémoglobine.

hémoglobines γ et β . La quantité de lumière absorbée n'a pas encore été déterminée.

Avant d'examiner les expériences qui ont été faites avec l'oxyhémoglobine α , nous chercherons comment se comporte une solution de l'espèce ordinaire γ lorsqu'elle est évacuée. Elle ne subit alors aucun changement et, après l'évacuation, absorbe à très peu près la même quantité de gaz qu'auparavant (peut-être un peu plus). C'est ce que montrent les exemples suivants.

Exemple 1. Une solution d'oxyhémoglobine γ à 13,52 %, secouée avec de l'air atmosphérique, a donné après évacuation 126 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*; on l'a ensuite étendue d'eau jusqu'à ce qu'elle fût au titre de 9,14 %, et secouée de nouveau avec de l'air atmosphérique, après quoi elle a dégagé 127 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*.

Exemple 2. Une solution d'oxyhémoglobine γ à 8,63 %, secouée avec de l'air atmosphérique, a donné après évacuation 118 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*; la solution évacuée a ensuite été étendue d'eau jusqu'à ce que son titre fût abaissé à 8,47 % et, après avoir de nouveau été secouée avec de l'air atmosphérique et puis évacuée, elle a dégagé 119 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*.

Les solutions d'oxyhémoglobine β se comportent d'une manière toute différente; comme le montrent les expériences suivantes, elles sont modifiées par l'évacuation.

Expérience 1. Une solution d'oxyhémoglobine β à 10,2 %, secouée avec de l'air atmosphérique, a donné après évacuation 78 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*; la solution évacuée a de nouveau été secouée avec de l'air atmosphérique et, après une nouvelle évacuation, elle n'a donné que 42,8 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de *Hgb*.

Expérience 2. Une solution à 6,4 % de la même oxyhémoglobine β que la précédente a été évacuée dans l'absorptiomètre; après y avoir fait complètement le vide, on a

déterminé la quantité d'oxygène pur qu'elle pouvait absorber et trouvé 42 cent. cub. par 100 gr. de *Hgb*, soit à peu près le même résultat qui a été obtenu par une autre voie dans l'expérience 1. Les déterminations absorptiométriques ont été réunies dans le tableau suivant.

| Pression de l'oxygène en millim. | Oxygène absorbé par 100 gr. de <i>Hgb</i> , en cent. cub. | Température. |
|----------------------------------|---|--------------|
| 0 | 0 | |
| 11,6 | 0,363 | 17,4 |
| 19,2 | 0,405 | 16,9 |
| 34,9 | 0,421 | 17,0 |
| 65,5 | 0,421 | 17,1 |

La courbe de dissociation construite à l'aide de ces valeurs est représentée dans la figure, p. 215, sous la marque α .

On trouve par une interpolation graphique les valeurs suivantes pour la dissociation de l'oxyhémoglobine α .

| Pression de l'oxygène en millim. | Oxygène absorbé par 100 gr. de <i>Hgb</i> , en cent. cub. |
|----------------------------------|---|
| 5 | 0,25 |
| 10 | 0,35 |
| 20 | 0,40 |
| 60 | 0,42 |

Dans les courbes représentées, p. 215, on a pris pour abscisses les pressions de l'oxygène en millimètres et pour ordonnées les quantités d'oxygène correspondantes en cent. cub. absorbées par 1 gr. de *Hgb* (à 0° et 760 mm). Les lettres δ , γ et α indiquent que les courbes de dissociation sont celles des oxyhémoglobines correspondantes.

Chapitre II.

Nous avons vu qu'il y a plusieurs espèces d'hémoglobine, lesquelles, par des traitements chimiques qui d'ailleurs sont tenus pour très peu efficaces, peuvent se transformer les unes dans les autres.

Maintenant se pose pour nous la question de savoir si l'hémoglobine que nous retirons du sang à l'état de cristaux, et qui, après une seconde cristallisation, a été appelée oxy-hémoglobine γ , est un composé homogène ou un mélange de différentes hémoglobines. Pour éclaircir cette question, nous examinerons 1) si l'hémoglobine provenant de divers échantillons du sang de la même espèce d'animal est identique, et 2) s'il est possible de constater dans l'hémoglobine ordinaire la présence d'hémoglobines renfermant une proportion différente d'oxygène en combinaison lâche.

1.

Si l'on désire, autant que possible, retirer du sang, à l'état de cristaux, toute l'hémoglobine qu'il renferme, et qu'on veuille éviter une seconde cristallisation tout en obtenant un produit pur, je proposerai le procédé suivant comme satisfaisant à ces conditions. Aux globules sanguins bien lavés dans l'appareil centrifuge et refroidis à zéro on ajoute de l'éther également à zéro et, après un repos de 12 heures dans un faible mélange réfrigérant, environ toute l'hémoglobine est séparée sous forme cristalline. Sous l'action de la force centrifuge, le contenu du verre dont on s'est servi se sépare en 4 parties bien tranchées : une couche supérieure d'éther ; au-dessous, une couche gélatineuse qui ferme le verre comme un bouchon et se laisse enlever tout d'une pièce ; puis viennent une couche d'une solution aqueuse d'hémoglobine peu concentrée et renfermant de l'éther, et enfin, au fond du verre, une couche de cristaux.

Ceux-ci examinés au microscope se montrent exempts de tout mélange étranger; on les lave dans de l'eau à zéro et les passe ensuite dans l'appareil centrifuge, après quoi ils sont prêts à être employés. Le stroma des globules sanguins se trouve dans la couche gélatineuse qui, sous le microscope, se montre composée d'une masse de détritux mélangés de cristaux.

Dans une série d'hémoglobines ainsi préparées et provenant d'échantillons de sang de chien pris au hasard, j'ai dans les solutions déterminé le résidu, la teneur en fer, la quantité d'oxygène absorbée par 1 gr. d'hémoglobine, à la pression atmosphérique, et le rapport d'absorption de la lumière (α_r , α_{fe} , α_{ox} , voir le chapitre précédent). Les résultats, qui sont consignés dans le tableau suivant, montrent que les rapports entre l'oxygène absorbé, d'une part, et le résidu, le fer et l'absorption de la lumière, de l'autre, sont très variables, et il en est de même du poids moléculaire de l'hémoglobine.

| N ^o | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. | VII. | VIII. |
|----------------|-------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|------------------|--------------------|---------------|------------------------------------|
| | Résidu Vol. %. | % de fer dans le résidu. | Oxygène par 100 gr. de résidu. | Oxygène par gr. de fer. | $\lambda = 545.$ | | | Poids mo- léculaire relatif. |
| | | | | | α_r | $10^3 \alpha_{fe}$ | α_{ox} | |
| I. | 9,6 | 0,357 | 138 | 385 | 0,1352 | 0,4826 | 0,1860 | |
| II. | 6,3 | 0,368 | 137 | 373 | " | " | " | |
| III. | 15,8 | 0,351 | 129 | 366 | 0,1199 | 0,4207 | 0,1540 | |
| IV. | 13,5 | 0,359 | 129 | 360 | 0,1399 | 0,5023 | 0,1810 | |
| V. | 9,6 | 0,367 | 129 | 352 | 0,1073 | 0,3938 | 0,1387 | |
| VI. | 15,3 | 0,362 | 127 | 350 | 0,1155 | 0,4178 | 0,1463 | |
| VII. | 13,5 | 0,364 | 126 | 348 | 0,1100 | 0,3978 | 0,1386 | 8000 |
| VIII. | 16,2 | 0,380 | 130 | 343 | 0,1316 | 0,4999 | 0,1713 | |
| IX. | 14,1 | 0,364 | 121 | 333 | 0,1293 | 0,4704 | 0,1567 | |
| X. | 15,8 | 0,377 | 125 | 332 | " | " | " | |
| XI. | 13,2 | 0,403 | 131 | 326 | 0,0902 | 0,3632 | 0,1184 | 5700 |
| XII. | 5,9 | 0,396 | 127 | 320 | " | " | " | |
| XIII. | 14,5 | 0,461 | 130 | 282 | 0,1017 | 0,4692 | 0,1325 | 15200 |
| XIV. | 5,0 | " | 121 | " | 0,1037 | " | 0,1250 | 3800 |
| XV. | 4,9 | " | 101 | " | " | " | " | |
| XVI. | " | 0,316 | " | " | " | " | " | |
| | | Poids moléculaire dans une solution aqueuse | | | | | 3000 | |
| | | id. id. solution alcaline | | | | | 3500 | |

Il résulte de ce tableau que la teneur en fer varie entre 0,32 et 0,46 %, et le poids moléculaire relatif entre 3000 et 15000 environ. Le poids moléculaire et la teneur en fer les plus faibles correspondent aux n^{os} XIV et XVI, qui ont cela de commun, que l'hémoglobine employée provient d'un sang qui avait séjourné pendant deux jours dans de la glace, tandis que les autres échantillons d'hémoglobine ont toujours été retirés d'un sang qui venait d'être extrait. Le sang conservé dans la glace ne présentait pas le moindre signe de décomposition. Le n^o XVI montre que le poids moléculaire de l'hémoglobine ne diffère guère, que le dissolvant soit une solution d'un carbonate alcalin ou de l'eau. Les fortes variations dans la teneur en fer et le poids moléculaire n'ont pas besoin d'être attribuées au noyau coloré de la molécule d'hémoglobine qui fixe l'oxygène et renferme du fer; elles peuvent tout aussi bien provenir des variations de la partie non colorée, qui, avec la précédente, constitue les deux parties dont nous croyons que la molécule d'hémoglobine se compose. La partie non colorée, comme nous l'avons montré dans un mémoire précédent, étant celle qu'on doit regarder comme fixant l'acide carbonique, qui est absorbé en quantité variable par l'hémoglobine, il n'aurait pas été sans intérêt de déterminer, en même temps que le poids moléculaire, l'absorption de ce gaz; mais je n'ai pas eu l'occasion de le faire.

D'où que proviennent les variations dans la teneur en fer et le poids moléculaire, il résulte en outre avec certitude du tableau que la composition du noyau coloré de la molécule d'hémoglobine n'est pas non plus constante. Car ni la quantité d'oxygène absorbée par gramme de fer (colonne IV), ni celle qui l'est par unité de lumière absorbée (colonne VII) ne sont constantes, tout aussi peu du reste que les nombres des colonnes V, VI et III. Si, dans les diverses colonnes, nous considérons la différence entre le nombre le plus fort et le plus faible exprimée en pour-cent du nombre le plus fort, nous trouvons

dans IV (oxygène par gr. de fer) environ 27 %; dans VII (α_{ox}) environ 36 %; dans V (α_r) environ 36 %; dans VI (α_{fe}) environ 28 % et dans III (oxygène par 100 gr. de résidu) environ 27 %. Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'erreur provenant d'une double détermination du rapport entre l'oxygène et le résidu n'atteint pas 1 % de la valeur, même si ces déterminations sont faites dans les conditions les plus difficiles (voir ce mémoire, p. 226). Le tableau nous apprend donc que l'hémoglobine provenant de différents échantillons de sang est un produit qui, abstraction faite de la situation des bandes d'absorption, n'est constant dans aucun de ses caractères essentiels.

Comme le montre un coup d'œil jeté sur les différentes colonnes du tableau, il n'y a entre les variations de l'absorption de la lumière, de celle de l'oxygène et de la teneur en fer aucune liaison bien apparente; cela est peut-être dû à la circonstance, que la substance dont nous nous occupons est un mélange de différentes hémoglobines, dans lesquelles ces 3 grandeurs sont différentes mais non proportionnelles.

En examinant de plus près les travaux des auteurs antérieurs, on reconnaît que la variabilité qui distingue l'hémoglobine n'est nullement inconciliable avec les résultats qu'ils contiennent. Les grandes différences que présentent leurs indications s'expliquent bien mieux, semble-t-il, par le fait que l'hémoglobine n'est pas un corps constant qu'en supposant, comme c'est en général le cas, qu'il s'est glissé dans les déterminations des erreurs notables, supposition à laquelle on ferait mieux, je crois, de ne recourir qu'avec prudence, surtout en matière de recherches biologiques, à moins cependant qu'on ne puisse constater des erreurs certaines dans la méthode employée.

En fait de recherches antérieures, on dispose en particulier d'abondants matériaux relativement à la détermination de la teneur en fer de l'hémoglobine et de son absorption d'oxygène

à la pression atmosphérique. Sans avoir la prétention d'être complet, j'en ferai ci-après une comparaison; mais pour rendre ces résultats comparables avec les miens, je m'en tiendrai aux recherches sur l'hémoglobine extraite du sang de chien et de cheval; je prends ces dernières parce que je décrirai plus loin quelques expériences faites avec du sang de cheval.

On trouvera dans le tableau suivant les indications relatives à la teneur en fer de l'hémoglobine.

| Auteurs. | Teneur en fer de l'hémoglobine. | |
|---|---------------------------------|---------|
| C. Schmidt. Citation d'après Hoppe-Seyler dans <i>Medicin-chem. Untersuch.</i> , p. 119 | 0,43 | Chien. |
| Hoppe-Seyler. <i>Medicin-chem. Untersuch.</i> , p. 189 | 0,42—0,45 | Chien. |
| Jaquet. <i>Zeitschrift f. physiol. Chemie</i> ; XII, p. 285 | 0,33 | Chien. |
| Kossel. Hoppe-Seyler. <i>Z. f. physiol. Chemie</i> , II, p. 150 | 0,47 | Cheval. |
| Otto. <i>Pflügers Archiv</i> , XXXI, p. 240 | 0,45 | Cheval. |
| Bücheler. Citation d'après Hüfner <i>Z. f. physiol. Chemie</i> , VIII, p. 361 | 0,47 | Cheval. |
| Hüfner. <i>Z. f. physiol. Chemie</i> , VIII, p. 362 | 0,46—0,47 | Cheval. |
| Zinoffsky. <i>Z. f. physiol. Chemie</i> , X, p. 16 | 0,33 | Cheval. |

La variation dans la teneur en fer, chez les différents auteurs, est grande; les valeurs oscillent entre 0,33 et 0,45 %, à peu près dans les mêmes limites que j'ai trouvées dans les expériences décrites plus haut (0,32—0,46 %). Pour ce qui concerne l'hémoglobine extraite du sang de cheval, la teneur en fer indiquée par les différents auteurs varie entre 0,33 et 0,47 %; les expériences décrites plus loin que j'ai faites avec cette hémoglobine m'ont également donné de grandes différences pour la teneur en fer.

Il importe en outre de remarquer que toute impureté des cristaux d'hémoglobine doit abaisser le chiffre de la teneur en fer; or il se trouve que ce sont précisément les expériences les plus récentes, celles dans lesquelles MM. Zinoffsky et Jaquet se sont efforcés, par des cristallisations répétées, de rendre les cristaux aussi purs que possible, qui ont donné les chiffres les plus bas. Il est donc d'autant plus vraisemblable que les différences qu'on constate chez les divers auteurs ne proviennent pas de la circonstance que certains d'entre eux ont opéré sur des substances impures, mais sont dues à ce que l'hémoglobine n'est pas un produit constant.

Relativement à la quantité d'oxygène absorbée par l'hémoglobine à la pression atmosphérique, on trouve dans la littérature les indications suivantes. Les nombres cités donnent en centimètres cubes, à 0° et 760 mm., l'absorption par 100 grammes d'hémoglobine.

Hémoglobine extraite du sang de chien.

M. Hoppe-Seyler (*Med. chem. Untersuch.*, p. 19) trouve dans une solution concentrée 168 cent. cub.

M. Dybkowski (*Med. chem. Untersuch.*, p. 117) trouve dans une expérience 155 cent. cub. Deux autres expériences lui ont donné des chiffres beaucoup plus faibles, mais il ajoute que, par suite de circonstances particulières (dégagement de CO_2), ces expériences ne peuvent servir à déterminer la teneur en oxygène de l'hémoglobine.

M. Preyer (*De Hæmogl. observ. et exper. Bonnæ 1866*) trouve par des déterminations absorptiométriques 180, 172 et 162 cent. cub.; il ajoute qu'un grand nombre de ses expériences n'ont pas réussi.

M. Worm-Müller (*Ber. d. Sächs. Gesellsch. d. Wissenschaften*, 1870, p. 351) trouve 168 et 159 cent. cub.

M. Hüfner (*Zeitschrift f. physiol. Chemie*, I, p. 329) trouve comme moyenne de 10 expériences 145 cent. cub. Les différentes déterminations varient entre 157 cent. cub. (dans une

solution à 5 %) et 131 cent. cub. (dans une solution à 2 %); la différence entre les valeurs maximum et minimum exprimée en pour-cent. est donc de 16 %. Suivant l. c. p. 389, il faut faire des corrections qui portent la moyenne à 159 cent. cub.; ces corrections sont sans influence sur l'écart entre les différentes déterminations.

Hémoglobine extraite du sang de cheval.

M. Strassburg (Pflügers Arch. Bd. IV, p. 454) trouve par évacuation 116, 79 et 59 cent. cub.; de nombreuses expériences (l. c. p. 460) lui donnent des valeurs qui oscillent entre les précédentes.

M. Setschenow (Pflügers Arch. Bd. XXII, p. 252) trouve, comme M. Strassburg, une absorption d'oxygène bien plus faible pour l'hémoglobine du cheval que pour celle du chien.

M. Hüfner (Zeitschrift f. physiol. Chemie, VIII, p. 359) trouve (méthode du remplacement par *CO*) une moyenne de 172 cent. cub.; la valeur maximum = 221 et la valeur minimum = 145, ce qui donne une différence de 34 % environ. Il trouve ensuite (méthode du remplacement par *NO*) pour la moyenne de 14 expériences 183 cent. cub.; la valeur maximum = 237 et la valeur minimum = 167, d'où un écart de 30 % environ.

Les indications que fournit la littérature sur l'absorption de l'oxygène par l'hémoglobine diffèrent donc à un haut degré. C'est surtout dans les recherches sur l'hémoglobine du cheval et, en particulier, dans les expériences ci-dessus mentionnées de M. Hüfner que nous trouvons une confirmation de nos résultats, car lorsque, en procédant par des méthodes sûres et précises, on trouve dans les différentes déterminations des écarts qui s'élèvent jusqu'au tiers environ de la valeur totale, il va de soi, pour ainsi dire, que la substance sur laquelle on a opéré n'a pas une composition constante. Les déterminations de M. Hüfner ayant été faites avec le spectro-photomètre, ses expériences doivent être comparées avec les résultats indiqués

sous la rubrique α_{ox} dans le tableau qui précède; l'écart entre les différentes expériences est également ici d'un tiers de la valeur totale (36 %).

Plusieurs auteurs rapportent qu'un grand nombre de leurs expériences n'ont pas réussi. En ne mentionnant pas ces expériences, on fait en partie abstraction des valeurs qui s'écartent le plus des valeurs moyennes; il peut être juste de procéder ainsi lorsqu'on considère l'hémoglobine comme un corps de composition constante et facilement décomposable. En réalité c'est tout le contraire. L'hémoglobine ne se décompose pas facilement lorsqu'on ne la soumet pas à un chauffage prolongé ou à l'action d'acides ou de vapeurs acides; par contre, comme le montrent mes expériences, ce n'est pas un corps de composition constante.

2.

Pour reconnaître si l'hémoglobine extraite du sang à l'état cristallin est un mélange de plusieurs hémoglobines absorbant inégalement l'oxygène, j'ai analysé quelques préparations obtenues à l'aide de cristallisations répétées, et en traitant à plusieurs reprises une grande quantité de cristaux par de petites portions d'eau, dans l'idée que des hémoglobines différant par leur teneur en oxygène présenteraient peut-être aussi des différences dans leur solubilité.

Il était à prévoir qu'on ne pourrait pas par ce procédé séparer complètement l'une de l'autre les différentes hémoglobines. Tout ce qu'on pouvait attendre, c'était de trouver, dans les diverses préparations ci-dessus mentionnées, telle ou telle modification d'hémoglobine en quantité un peu différente. C'est pourquoi, après avoir constaté dans plusieurs d'entre elles que la quantité d'oxygène absorbée, tant par rapport au résidu qu'à

la teneur en fer, variait dans des préparations de solubilité différente, j'ai interrompu ces expériences. Celles-ci montrent certainement, je crois, que l'hémoglobine est un produit mélangé; quant à dire si elle se compose des hémoglobines décrites dans le chapitre I^r ou d'autres modifications analogues, c'est une question qui, pour le moment, doit rester indécise.

Les expériences suivantes ont été faites avec de l'hémoglobine de chien.

Expérience 1.

L'analyse d'une solution de cristaux d'hémoglobine à 13,2 %, a donné 131,2 cent. cub. d'oxygène par 100 gr. de résidu (que nous désignerons par *R*) et 325,9 cent. cub. du même gaz par gramme de fer; la teneur en fer était de 0,403 %.

Après un lavage des cristaux avec de l'eau à zéro, l'analyse des cristaux restants, dans une solution également à 13,2 %, a donné par 100 gr. de *R* 131,2 et par gr. de fer 314,5 cent. cub. d'oxygène; la teneur en fer = 0,433 %.

Expérience 2.

Après une analyse de l'eau-mère (I) provenant de la première précipitation des cristaux d'hémoglobine, les cristaux ont été dissous et on les a fait cristalliser de nouveau dans un mélange réfrigérant, ce qui a donné l'eau-mère (II) et des cristaux qui ont été dissous.

On a trouvé par 100 gr. de *R* dans l'eau-mère I (à 2,45 %) 100,3, dans l'eau-mère II (à 8,63 %) 118,1 et dans la solution des cristaux (à 2,05 %) 110,3 cent. cub. d'oxygène.

Expérience 3.

Après une analyse de l'eau-mère provenant de la première précipitation des cristaux d'hémoglobine, les cristaux ont à plusieurs reprises été traités par de petites portions d'une solution de carbonate de soude à $\frac{1}{20}$ %, ce qui a donné les solutions I, II, III, dont la première et la dernière devaient renfermer respectivement un excès des cristaux les plus facile-

ment et les moins facilement solubles; enfin on a analysé un mélange des 3 solutions (solution IV) et trouvé

| | O absorbé par 100 gr. de R. | O absorbé par 1 gr. Fe. | Teneur en Fe. |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------|
| Eau-mère (8,37 ‰) | 122 | 322 | 0,377 |
| Solution I (14,72 ‰) | 131,3 | 347 | 0,378 |
| Solution II (16,04 ‰) | 133,7 | 337 | 0,397 |
| Solution III (6,56 ‰) | 144,1 | | |
| Solution IV (11,82 ‰) | 131,1 | | |

Expérience 4.

Après avoir dissous les cristaux d'hémoglobine et les avoir fait de nouveau cristalliser dans un mélange réfrigérant, on a analysé l'eau-mère ainsi qu'une solution des cristaux et trouvé :

| | | | |
|-------------------|-------|----------------------|------------------|
| Eau-mère (8,44 ‰) | 134,4 | cent. cub. d'oxygène | par 100 gr. de R |
| Solution (8,63 ‰) | 132,1 | — | — |

D'après les expériences qui précèdent, l'hémoglobine, dans l'eau-mère provenant de la première précipitation des cristaux, absorbe moins d'oxygène par gramme. Par contre, après une nouvelle cristallisation, les cristaux précipités en absorbent moins que l'eau-mère. Cela résulte de l'expérience 2 et l'expérience 4 le fait entrevoir; si la différence provenait de ce que les cristaux sont plus purs que l'eau-mère, ceux-ci, à l'inverse de ce qui a lieu, devraient par rapport au résidu absorber plus d'oxygène que l'eau-mère. On aurait sans doute obtenu une séparation plus complète avec une plus longue série de cristallisations; mais alors, au lieu d'employer simplement un mélange réfrigérant, on devrait recourir à une addition d'alcool, ce que je désirais éviter.

En raison de sa grande variabilité, l'hémoglobine de cheval (voir les expériences citées plus haut de MM. Strassburg, Setschenow et Hüfner) semble devoir se prêter tout particulièrement aux expériences dont il s'agit ici, d'autant plus

que M. Hoppe-Seyler¹⁾ a fait voir qu'on obtient en la préparant 2 espèces de cristaux de grosseur différente mélangés ensemble. J'ai donc fait avec cette hémoglobine quelques expériences, et ai pu constater l'existence des deux espèces de cristaux, mais il m'a été impossible de les séparer; aussi ai-je dû me borner à comparer l'eau-mère avec les cristaux et avec les préparations obtenues en traitant à plusieurs reprises ces derniers par de petites portions d'eau. Comme l'eau-mère, dans ce genre d'expériences, ne doit pas renfermer de l'alcool, dont on ne peut ensuite plus la débarrasser, j'ai d'abord, suivant ma méthode ordinaire, précipité les cristaux avec l'éther et analysé ensuite l'eau-mère. Mais à cause de la grande facilité avec laquelle se dissout l'hémoglobine du cheval, je n'ai pas obtenu assez de cristaux pour les expériences de solubilité; j'ai donc, dans une autre portion de la même hémoglobine, précipité les cristaux par l'alcool, et traité à deux reprises une grande quantité de ces derniers par de petites portions d'une solution de carbonate de soude à $\frac{1}{20}$ 0/0, ce qui m'a donné les solutions I et II.

Dans le tableau ci-dessous, les notations α_r , α_{fe} et α_{ox} ont la même signification que dans le tableau p.

Expérience 5. Hémoglobine du cheval.

| | Vol. % du résidu. | % de Fe dans le résidu. | O dans 100 gr. de résidu. | O dans 1 gr. de Fe. | $\lambda = 545$ | | |
|-------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| | | | | | α_r | $10^3 \alpha_{fe}$ | α_{ox} |
| Eau-mère. | 26,2 | 0,359 | 123,8 | 336 | 0,1369 | 0,5047 | 0,1694 |
| Solution de cristaux I | 16,5 | 0,369 | 108,4 | 302 | 0,1389 | 0,4977 | 0,1505 |
| Solution de cristaux II | 10,9 | 0,420 | 125,4 | 299 | 0,1596 | 0,6693 | 0,2002 |

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, II, p. 149.

En examinant de plus près cette expérience, on verra facilement que la différence entre les différentes préparations ne se laisse pas expliquer par la supposition, que d'ailleurs rien ne justifie, que l'une d'elles est plus pure que les autres, mais que nécessairement on a eu affaire à des substances de composition chimique différente.

Si l'on considère, d'une part, qu'un traitement aussi peu énergique que celui qui consiste à dissoudre à plusieurs reprises des cristaux d'hémoglobine dans de petites portions d'eau donne cependant des préparations différentes, et, de l'autre, la grande variabilité constatée au chapitre précédent dans l'hémoglobine extraite par un procédé identique de différents échantillons de sang du même animal, il me semble bien prouvé que l'hémoglobine ordinaire est un mélange de plusieurs hémoglobines de nature différente.

Il me reste à rappeler que M. Krüger¹⁾ a fait voir que les cristallisations répétées exercent une influence sur les rapports d'absorption déterminés par le photomètre. Il admet que ce changement est dû à une transformation de l'hémoglobine produite par la cristallisation; c'est possible, mais par ce procédé il se sépare peut-être aussi des hémoglobines préformées de nature différente. En voyant les différences notables que M. Krüger a constatées pour les rapports d'absorption des divers produits de la cristallisation, on trouvera que, relativement aux expériences décrites dans ce chapitre, je ne suis pas non plus en désaccord avec les faits qui ont été décrits par d'autres auteurs.

En résumé:

- 1) On peut préparer plusieurs espèces d'hémoglobine qui, dans les mêmes conditions extérieures, absorbent une quantité d'oxygène

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie, XXIV, p. 47.

différente, mais qui sont d'ailleurs voisines les unes des autres par leurs caractères chimiques (Chap. I).

- 2) Les cristaux d'hémoglobine extraits du sang par la méthode ordinaire ont une composition variable, même chez des animaux de la même espèce (Chap. II, 1).
 - 3) On peut constater que l'hémoglobine ordinaire est un mélange de plusieurs hémoglobines qui absorbent une quantité d'oxygène différente (Chap. II, 2).
-