

## Sur la teneur en oxygène des cristaux d'oxyhémoglobine.

Par

**Chr. Bohr** et **Soph. Torup.**

(Communiqué dans la séance du 10 mai 1889.)

Des recherches antérieures<sup>1)</sup> ont établi que la quantité d'oxygène qu'une solution d'hémoglobine absorbe par gramme de cette substance varie avec le degré de concentration de la solution, même si les pressions auxquelles on soumet l'oxygène sont élevées. Il en résulte que l'opinion généralement admise, d'après laquelle l'hémoglobine absorbe par gramme 1,5—1,6 cent. cub. d'oxygène, perd, sous certains rapports, beaucoup de sa valeur, car cette absorption ne s'est produite que dans des limites très étroites, lorsque la solution employée avait une concentration de 2 % environ. On ne saurait donc guère admettre le chiffre ci-dessus dans des conclusions concernant l'hémoglobine en général, par exemple dans le calcul de son poids moléculaire, et il était également évident que, pour en bien comprendre la dissociation, il fallait étudier l'absorption de l'oxygène par cette substance dans des conditions plus variées qu'il n'avait été jugé nécessaire jusqu'ici; aussi avons-nous pensé qu'il importait d'abord de déterminer la quantité d'oxygène que renferment les cristaux séchés d'oxyhémoglobine.

---

<sup>1)</sup> Bohr, *Exper. Untersuch. über Sauerstoffaufnahme des Blutfarbstoffes.* Copenhague 1885, p. 43.

globine. A ces raisons venait s'ajouter la circonstance que, dans des expériences exécutées auparavant dans le laboratoire de physiologie, l'hémoglobine avait quelquefois absorbé des quantités très variables d'oxygène, même dans des solutions ayant la même concentration, ce qui devait faire croire qu'il existait plusieurs espèces d'hémoglobine, et cette question pouvait peut-être aussi être en partie éclaircie par la recherche de la quantité d'oxygène contenue dans les cristaux séchés d'oxyhémoglobine.

La question de la teneur en oxygène des cristaux d'oxyhémoglobine a été traitée auparavant par M. Hoppe-Seyler<sup>1)</sup>, mais les recherches de cet auteur n'ont abouti à aucun résultat certain. Il avait mis les cristaux séchés dans un récipient avec de l'air atmosphérique, dont la quantité était déterminée plus tard par la teneur en azote de l'air évacué, et avait alors constaté que, pendant l'évacuation et le chauffage simultané des cristaux, l'oxygène mis en liberté était en tel excès sur celui de l'air du récipient, que chaque gramme d'hémoglobine dégageait environ 0,5 cent. cub. d'oxygène. M. Hoppe-Seyler croit cependant que l'hémoglobine renfermait une plus grande quantité d'oxygène, mais que, à l'état sec, elle le laissait difficilement dégager, et que l'oxygène avait pour elle une telle affinité qu'il n'en avait trouvé qu'une fraction dans l'air évacué. Dans les conditions où il a fait son expérience, c'était certainement possible; pour obtenir des résultats exacts, il faut modifier le procédé, comme nous allons l'indiquer, et on trouve alors que la quantité d'oxygène absorbée par gramme d'hémoglobine n'est en réalité que le quart environ de celle qui est fixée par une solution d'hémoglobine à 2%.

**Préparation des cristaux d'hémoglobine.** Ces cristaux sont préparés avec du sang de chien, défibriné par des lavages répétés des globules sanguins, dans l'appareil

---

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler, Medicinisch-Chemische Untersuch. Berlin 1866, p. 191.

centrifuge, avec une solution de chlorure de sodium à 0,70 %. Le magma très concentré ainsi obtenu est additionné d'un peu d'éther, puis refroidi dans un mélange réfrigérant, et on lave les cristaux produits dans une grande quantité d'eau distillée à zéro. Les cristaux, lavés et passés dans l'appareil centrifuge, sont ensuite étendus en couche très mince sur des plaques de verre où l'on fait passer sans interruption un fort courant d'air, qui les sèche au bout de quelques heures, et ils forment alors une croûte mince et friable qu'on détache et pulvérise. La poudre rouge ainsi préparée renferme 15 % d'eau environ; elle est soluble dans l'eau et la solution, en ce qui concerne la situation des bandes d'absorption, donne le spectre ordinaire de l'oxyhémoglobine. Lorsque le séchage ci-dessus décrit est mené rapidement, le spectre de la solution ne présente aucune bande de méthémoglobine.

**Détermination de l'oxygène.** Pour déterminer la quantité d'oxygène que renferme la poudre cristalline séchée, on en introduit une partie dans le récipient *f* (voir la figure), qui est muni à ses deux extrémités d'un robinet hermétique et, après y avoir, pendant quelque temps, fait passer par aspiration de l'air atmosphérique pur, on ferme les robinets. On détermine ensuite, d'une part, par un pesage, le poids de la poudre du récipient et, de l'autre, la quantité d'eau dans un échantillon de la poudre. Le récipient, comme le montre la figure, est alors réuni hermétiquement à la pompe à mercure par les bouts rodés de leurs tubes, et on fait complètement le vide dans celle-ci, en même temps que dans le réservoir (*e*), qui contient une assez grande quantité d'eau distillée. Cela fait, on ouvre le robinet inférieur du récipient et la fine poudre cristalline tombe par parcelles dans l'eau du réservoir (*e*), où elle se dissout; il faut seulement avoir soin que cette poudre ne soit pas humide pendant qu'elle est encore dans le récipient, car elle forme alors une masse

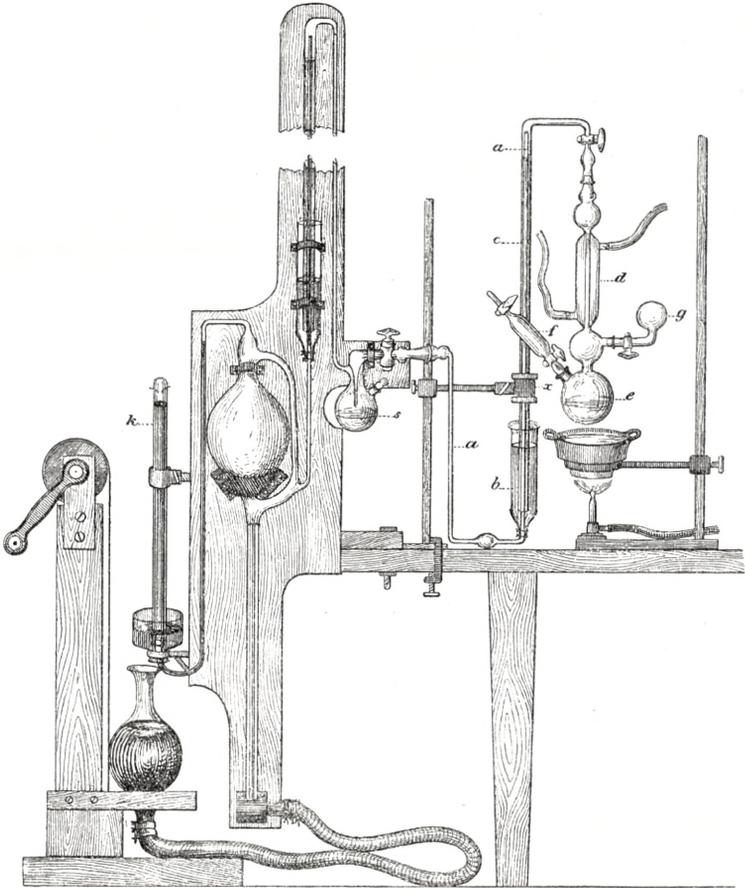
visqueuse qui ne peut pas passer par l'ouverture du robinet. La poudre une fois dissoute, on évacue complètement la solution; les gaz se rassemblent dans l'eudiomètre (*k*) et sont analysés par la méthode de Bunsen, avec les modifications qui sont mentionnées dans des travaux antérieurs du laboratoire. De la quantité d'azote trouvée, on déduit la quantité d'air atmosphérique qui se trouvait avec la poudre dans le récipient (*f*), et de la quantité totale d'oxygène obtenue on retranche celle qui correspond à l'air atmosphérique du récipient; le reste provient de l'hémoglobine. Ce résultat serait fautif si l'hémoglobine renfermait de l'azote en combinaison lâche, mais la quantité maximum d'azote par gramme absorbée par l'hémoglobine est si petite qu'on peut la considérer comme négligeable.

La pompe dont on s'est servi dans ces expériences et qui, depuis longtemps, est en usage au laboratoire<sup>1)</sup>, où on l'emploie pour toutes les évacuations, est représentée dans la figure ci-jointe. C'est la pompe à mercure de Hagen<sup>2)</sup>, disposée de manière à pouvoir rassembler dans l'eudiomètre tous les gaz évacués, et munie de plusieurs récipients pour l'évacuation des liquides. Il suffira ici de décrire ces derniers. Dans le tube rodé du réservoir à acide sulfurique (*s*) est engagé un tube mince (*a*) recourbé, à bout également rodé, qui traverse le fond du réservoir à mercure (*b*) et monte jusqu'à 800 millim. au-dessus de la surface du mercure dans ce dernier. Ce tube (*a*) est enfermé dans un tube plus large *c* dont l'extrémité inférieure plonge dans le mercure, tandis que, dans sa partie supérieure, après s'être recourbé, il se termine en un bout rodé où est engagé le récipient pour les liquides à évacuer. Le tube *c* est fixé dans une douille métallique qui peut tourner dans un anneau fixe (*x*); grâce à cette disposition,

<sup>1)</sup> Bohr, l. c. p. 12 et suivantes.

<sup>2)</sup> Bessel-Hagen, Wiedemanns Ann. 12, p. 425, 1881.

on peut, sans qu'il pénètre de l'air dans la pompe, faire tourner le tube *c* autour de *a* et secouer ainsi fortement et sans interruption le liquide contenu dans *e*, même lorsque l'air est très raréfié et que le mercure est monté dans l'intervalle entre les



tubes *a* et *c* jusqu'à la hauteur du baromètre environ. Dans la figure, *d* est un réfrigérateur, *g* un réservoir vide d'air réuni à la pompe par un tube rodé et contenant de l'acide oxalique, dont on peut avoir à se servir dans certaines expériences, et *f* le récipient mentionné plus haut, qui, dans

l'expérience dont il s'agit, renfermait l'hémoglobine sous forme de poudre sèche; dans la détermination des gaz du sang ou d'un autre liquide, on le remplit de ce dernier. La méthode d'évacuation ici décrite présente cet avantage, qu'il est possible de secouer et de chauffer en même temps les solutions qu'on évacue, sans que la complète herméticité que produit la pompe de Hagen en soit compromise. Toutes les pièces de cette pompe sont soudées entre elles ou réunies par des tubes rodés; ces derniers, que fournit M. Müller, à Bonn, sont faits avec une telle perfection, que cette pompe peut tenir le vide pendant des semaines, sans qu'il y pénètre de l'air en quantité sensible.

Ce qui a été obtenu par la méthode que nous avons employée pour sécher les cristaux et en extraire leurs gaz, c'est d'abord que les cristaux d'hémoglobine n'ont pas été partiellement transformés en méthémoglobine, et ensuite que l'évacuation a été complète, puisqu'elle a été faite après que les cristaux d'hémoglobine étaient dissous dans l'eau.

Nous décrirons maintenant nos différentes expériences. Les gaz ont été mesurés à 0° et à 760<sup>mm</sup>.

I. Cristaux d'oxyhémoglobine pulvérisés renfermant 13,57 % d'eau, préparés par la méthode précédente.

1. De 4,72 gr. de ces cristaux (pesés complètement secs), on a extrait par évacuation du récipient qui les renfermait, 0,239 cent. cub. d'acide carbonique, 23,598 cent. cub. d'azote et 7,958 cent. cub. d'oxygène. A 23,598 cent. cub. d'azote correspondent dans l'air atmosphérique 6,254 cent. cub. d'oxygène. Par conséquent, les cristaux ont dégagé 7,958 — 6,254 = 1,704 cent. cub. d'oxygène, soit par gramme d'hémoglobine, 0,401 cent. cub. d'oxygène et 0,056 cent. cub. d'acide carbonique.

2. De 4,632 gr. de cristaux on a extrait de la même manière 0,236 cent. cub. d'acide carbonique, 25,453 cent. cub.

d'azote et 8,071 cent. cub. d'oxygène. A 25,453 cent. cub. d'azote correspondent dans l'air atmosphérique 6,746 cent. cub. d'oxygène; les cristaux ont donc dégagé  $8,071 - 6,746 = 1,325$  cent. cub. d'oxygène, soit par gramme d'hémoglobine 0,331 cent. cub. d'oxygène et 0,056 cent. cub. d'acide carbonique.

Avec les cristaux pulvérisés d'hémoglobine qui ont servi pour ces déterminations, on a en outre fait deux solutions qui ont été secouées avec de l'air atmosphérique et puis évacuées.

1. Une solution d'hémoglobine à 2,91 % a, par gramme d'hémoglobine, dégagé 0,89 cent. cub. d'oxygène.

2. Une solution d'hémoglobine à 3,39 % a, par gramme d'hémoglobine, dégagé 0,75 cent. cub. d'oxygène. L'oxygène dissous dans l'eau a été déduit dans ces calculs comme dans les suivants.

II. Cristaux pulvérisés d'hémoglobine renfermant 15,75 % d'eau.

On a opéré sur 3,574 gr. de ces cristaux; puis après avoir évacué le récipient et fait les corrections relatives à l'air atmosphérique, on a trouvé qu'ils avaient dégagé 1,398 cent. cub. d'oxygène et 0,07 cent. cub. d'acide carbonique, soit par gramme d'hémoglobine, 0,39 cent. cub. d'oxygène et 0,02 cent. cub. d'acide carbonique.

On a ensuite avec ces cristaux fait deux solutions, dont l'une concentrée et l'autre diluée, qui ont été secouées avec de l'air atmosphérique et puis évacuées.

1. Une solution d'hémoglobine à 2,99 % a, par gramme d'hémoglobine, dégagé 0,99 cent. cub. d'oxygène.

2. Une solution d'hémoglobine à 0,598 % a, par gramme d'hémoglobine, dégagé 1,19 cent. cub. d'oxygène.

Il résulte de ces expériences que les cristaux d'oxyhémoglobine séchés à l'air renferment en moyenne par

gramme 0,37 cent. cub. d'oxygène (0,40, 0,33, 0,39), ou, à très peu près, le  $\frac{1}{4}$  de la quantité d'oxygène qu'on trouve d'ordinaire dans les solutions d'hémoglobine faites avec des cristaux humides d'oxyhémoglobine.

Les solutions préparées avec des cristaux secs renferment par gramme d'hémoglobine bien plus d'oxygène que les cristaux eux-mêmes, mais les valeurs observées sont ici plus variables, de 0,75 à 1,19 cent. cub. d'oxygène par gramme. En somme, ces valeurs sont plus faibles que celles qu'on obtient dans des solutions de cristaux humides et ayant la même concentration.

Les cristaux d'oxyhémoglobine séchés à l'air renferment donc une quantité d'oxygène constante et très petite, plus petite que celle que ces mêmes cristaux absorbent dans une solution. Maintenant se pose la question de savoir si l'hémoglobine n'est pas modifiée par le séchage, et si la petite quantité d'oxygène absorbée est due à sa faible teneur en eau — elle n'en renfermait en effet que 15 % — ou si l'hémoglobine s'est par le séchage transformée en une nouvelle modification moins avide d'oxygène. Il n'est guère possible de résoudre cette question seulement par une analyse des cristaux séchés à l'air. Pour y répondre, il faudra examiner si leur solution comparée avec une solution de cristaux humides a subi des changements dans quelques points importants. Les recherches que nous venons d'exposer sur des solutions d'hémoglobine séchée à l'air ne suffisent pas pour cette détermination; d'autres recherches plus étendues sur ce point, qui seront publiées dans un prochain mémoire, ont prouvé, croyons-nous, que c'est la dernière alternative qui se réalise, à savoir que l'hémoglobine, par le séchage, se transforme en une nouvelle modification qui diffère de celles que l'on connaît jusqu'à présent.

Laboratoire de physiologie de l'Université de Copenhague.