

## Sur une modification que la lumière produit dans la méthémoglobine.

Expériences faites au Laboratoire de physiologie de l'Université.

Par

Johannes Bock.

(Présenté dans la séance du 25 janvier 1895.)

Quelques recherches au spectroscope sur la méthémoglobine m'ont fait remarquer que de faibles solutions de méthémoglobine exposées à une forte lumière solaire, changent de couleur et de spectre. En examinant de plus près, je suis arrivé au résultat suivant. Ces modifications tiennent à ce que la méthémoglobine se transforme en une autre espèce d'hémoglobine, et comme le nouveau produit est dû à la lumière, je lui ai donné le nom de *photométhémoglobine*. Avant d'en arriver à décrire plus en détail les propriétés de cette substance, je parlerai de la méthode que j'ai employée pour préparer la méthémoglobine. Cette méthode est au fond celle qu'indique M. Hüfner <sup>1)</sup>. Pour ladite préparation j'ai toujours employé du sang de chien. Les globules sanguins se lavèrent à plusieurs reprises dans l'appareil centrifuge avec une solution de chlorure de sodium à 0,7 %; après avoir refroidi à zéro on ajouta de l'éther; puis, ayant laissé reposer dans un mélange

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. physiol. Chemie, vol. 8, p. 366.

réfrigérant, on sépara par la force centrifuge le stroma, et les cristaux furent dissous dans de l'eau, sur quoi l'on fit évaporer l'éther. La solution d'oxyhémoglobine étant saturée, on ajouta à 37° environ du cyanoferrure de potassium en dissolution. D'après la recette Hüfner, une bonne proportion est celle de 3 ou 4<sup>cc</sup> de solution saturée par litre d'hémoglobine en dissolution. Mais ce rapport m'a paru trop faible dans la plupart des cas; c'est pourquoi j'ai suivi l'indication de M. Jæderholm<sup>1)</sup>, celle d'ajouter du cyanoferrure de potassium, jusqu'à ce que tel échantillon qu'on vient de prendre, puisse être encore additionné de ce composé sans changer de spectre. Pour produire des cristaux de méthémoglobine, il suffit d'ajouter environ  $\frac{1}{5}$  du volume, et de tenir la solution dans un mélange réfrigérant. On pressa ces cristaux entre deux papiers à filtrer, et, après des lotions répétées à l'eau distillée, ils passèrent à l'appareil centrifuge. Enfin le reste des cristaux fut dissous dans de l'eau. Les solutions préparées de cette manière, étaient colorées en brun; réaction neutre; au spectroscope, la raie du rouge qui caractérise la méthémoglobine.

Si, ayant préparé de la sorte une faible solution (0,1 à 0,5 %) de méthémoglobine, on l'expose pendant quelque temps, préférentiellement en couche mince, à de forts rayons solaires, on constatera les modifications que voici: de brun le liquide devient rouge sombre à teinte jaunâtre sur le bord, et simultanément on voit disparaître de la partie rouge du spectre la raie de la méthémoglobine; les autres raies s'estompent, et dans la portion verte du spectre apparaît un large ruban ayant à peu près l'aspect de la raie qui caractérise la raie d'absorption de l'hémoglobine réduite; mais ce ruban est un peu refoulé vers la partie violette du spectre. Dans le bleu du spectre, on trouve encore une portion plus claire, tandis que la partie violette est fortement assombrie. Le spectre ne se modifie pas,

---

<sup>1)</sup> Nordisk medicinsk Arkiv, vol. 16, n° 17, 1884.

si l'on secoue ladite solution avec de l'air; même après ces modifications la solution a une réaction neutre.

Cette transformation se produit rapidement en couche mince et dans de faibles solutions; mais elle a également lieu, quoique lentement, si la couche est épaisse et que les solutions soient fortes. Veut-on faire ces expériences d'une manière conforme au but, on doit se servir des fioles de teinture carrées (Nielsen) dont parle M. Salomonsen<sup>1)</sup>. Si l'on y met 10<sup>cc</sup> de méthémoglobine en dissolution, ces fioles couchées à plat présenteront à la lumière une couche mince. Debout, elles offrent à l'examen spectroscopique une couche convenable. Je vais communiquer quelques expériences sur la rapidité avec laquelle s'effectue la modification. Je les ai faites par une chaude et radieuse journée, le 25 août 1894.

Titre de la solution de méthémoglobine.	Épaisseur de la couche.	Temps écoulé.	Modification.
0,1 ‰	3mm	1/2h	Transformation complète en photo-méthémoglobine.
0,2 ‰	"	1 1/2h	"
0,4 ‰	"	1 1/2h	"
0,8 ‰	"	5h	"
4 ‰	1mm,5	13h	Encore vestiges de méthémoglobine.
"	"	16h	Transformation complète en photo-méthémoglobine.

J'ai fait plus de 100 expériences de ce genre sur de la méthémoglobine provenant de cinq préparations différentes, et j'ai toujours constaté la même modification. Laisait-on la méthémoglobine à l'abri de la lumière, la transformation n'avait lieu en aucun cas. C'est ainsi que j'ai conservé dans l'obscurité une solution faible et stérilisée de méthémoglobine qui, au bout

<sup>1)</sup> Salomonsen: Bakteriologisk Teknik, p. 22, Copenhague 1894.

de cinq mois, n'avait pas subi de modification; sur quoi elle fut exposée à la lumière du soleil, et se transforma comme d'ordinaire en photométhémoglobine. Toutes les fois que j'ai expérimenté à la lumière sur la méthémoglobine, j'en ai pris un échantillon; je l'ai enveloppé soigneusement dans de l'étain battu et l'ai placé dans les mêmes conditions que les doses exposées à l'action de la lumière. Les échantillons ainsi soustraits à l'action lumineuse, n'ont jamais subi de modification.

La photométhémoglobine placée à l'abri de la lumière ne redevient pas méthémoglobine. Ainsi j'ai conservé à l'abri de la lumière, pendant quatre mois, une solution stérile de photométhémoglobine, sans qu'elle subit aucune modification.

Dans ces expériences il était clair que l'intensité de la lumière jouait un grand rôle. La modification s'effectuait beaucoup plus rapidement aux rayons solaires directs qu'à la lumière diffuse. En outre j'ai constaté qu'en hiver, à la lumière moins intense et de courte durée, la modification se fait bien plus lentement qu'en été.

La chaleur ne paraît pas jouer de rôle. En tout cas, agissant seule, elle n'a pas pu produire ladite modification dans des solutions faibles de méthémoglobine qui depuis assez longtemps séjournèrent, à l'abri de la lumière, dans un thermostat à 37°.

La modification dont il s'agit, s'est opérée sans l'intervention des bactéries; car on pouvait la provoquer dans des solutions stériles. Ces dernières se préparaient comme suit: la solution de méthémoglobine traversait à haute pression un filtre Chamberland et passait dans un alambic stérilisé. Filtre et alambic subissaient ensemble une stérilisation.

De cette manière on ne peut stériliser que des solutions faibles; car le filtre est imperméable aux solutions fortes. Dans la majorité de mes expériences, j'ai employé des solutions stérilisées ainsi, et me suis convaincu de leur stérilité en les inoculant dans la gélatine. C'est pendant la nuit ou dans une

chambre obscure que furent tant préparées que stérilisées les solutions de méthémoglobine employées dans mes expériences ultérieures.

La présence de l'oxygène ne parut pas jouer de rôle. Ainsi la modification eut lieu dans une fiole remplie jusqu'au bouchon. Dans un autre cas on élimina l'oxygène d'une solution de méthémoglobine en y faisant barboter de l'acide carbonique pendant plusieurs heures, sur quoi la fiole fut scellée au chalumeau. La modification s'effectua de la manière habituelle dans l'espace de deux jours, et dans ce cas aussi je mis à l'abri de la lumière un échantillon témoin traité de la même manière, et dont la méthémoglobine ne se modifia pas.

La lumière artificielle, au moins celle qui n'est pas très intense, semble ne provoquer ladite modification que lentement. Je n'ai pas eu l'occasion d'examiner l'action de rayons provenant des diverses régions du spectre; mais ce qu'il y a de plus vraisemblable, c'est que l'effet est dû à l'action des rayons chimiques.

En étudiant plus à fond la photométhémoglobine au spectroscope, j'ai employé une solution faible de méthémoglobine préparée à l'abri de la lumière, et qui, passée au filtre Chamberland, fut répartie en deux alambics stérilisés, dont l'un subit l'action lumineuse du soleil, d'où résulta la modification en question au bout de huit heures; l'autre fut conservé à l'abri de la lumière. On étendit convenablement les solutions, et l'absorption de la lumière fut examinée pour les diverses parties du spectre, à l'aide d'un appareil Vierordt-Krüss. Dans le tableau ci-dessous,  $\lambda$  désigne la longueur d'onde (en millionsièmes de millimètres) pour les rayons de la partie explorée du spectre,  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction trouvé.

## Photométhémoglobine.

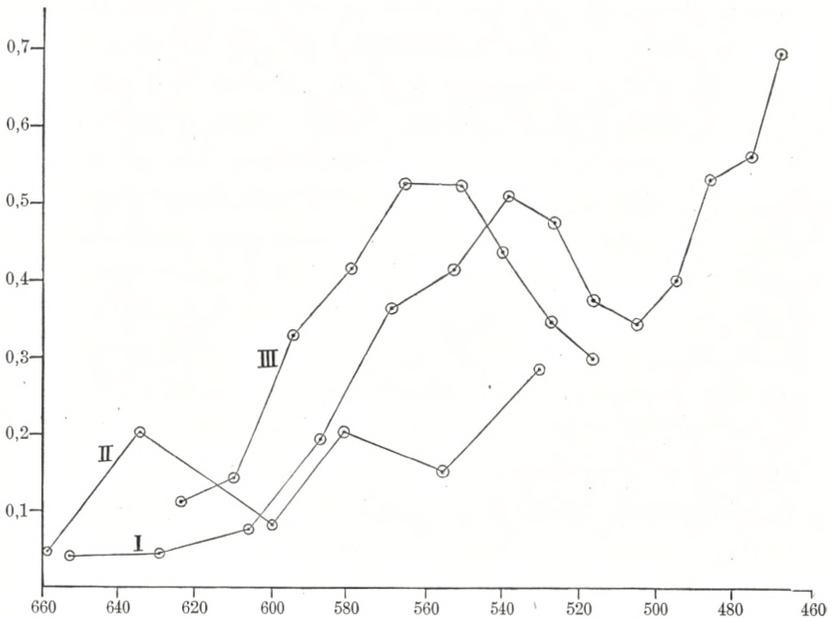
Titre : 0,000963.

$\lambda$	$\epsilon$	$\lambda$	$\epsilon$
653	0,03982	526	0,47900
629	0,04478	516	0,37426
607	0,07652	505	0,34430
587	0,19377	495	0,40288
569	0,36767	486	0,53780
553	0,41488	476	0,56101
539	0,51423	468	0,70038

## Méthémoglobine.

Titre : 0,000943.

$\lambda$	$\epsilon$
659	0,04620
634	0,20350
600	0,08070
581	0,20350
556	0,15388
529	0,29018



Cette figure donne une représentation graphique des déterminations : les abscisses figurent les longueurs d'onde, les ordonnées sont les coefficients d'extinction. I est la courbe de

la photométhémoglobine, II celle de la méthémoglobine, III une courbe indiquée par M. Torup<sup>1)</sup> et relative à l'hémoglobine réduite.

Cette même figure montre qu'à tous égards les spectres de la méthémoglobine et de la photométhémoglobine diffèrent complètement et qu'en outre le spectre de la photométhémoglobine ressemble beaucoup à celui de l'hémoglobine réduite, mais qu'il se porte vers la région verte du spectre. D'après M. Torup, le milieu de la raie d'absorption de l'hémoglobine réduite se trouve à  $\lambda = 559$ ; j'ai trouvé le milieu de la raie d'absorption de la photométhémoglobine à  $\lambda = 535$ .

M. Torup n'indiquant aucunement le titre de la solution qu'il emploie pour dresser la courbe, j'ai cherché à m'en faire une idée. Suivant, dans ce but, la relation absorptrice indiquée par M. Hüfner<sup>2)</sup> pour l'hémoglobine réduite et pour la région D 63 E—D 79 E, j'ai calculé le titre et trouvé environ 0,0007. Comme on le voit par la figure, dans les courbes de la photométhémoglobine et de l'hémoglobine réduite, les ordonnées atteignent à peu près les mêmes valeurs pour le maximum de la raie d'absorption; mais le titre de la photométhémoglobine étant 0,000963, celui de l'hémoglobine réduite environ 0,0007, on voit que la plus sombre partie de la raie d'absorption absorbe un peu moins de lumière, quand il s'agit de photométhémoglobine, que pour l'hémoglobine réduite.

En solutions acidules, neutres et alcalines, la photométhémoglobine a le même spectre, et contraste ainsi avec la méthémoglobine. Une trop forte addition d'acide estompe le spectre; à cet égard la méthémoglobine se comporte de même.

Ensuite j'ai tâché de préparer des cristaux de photométhémoglobine. Ici j'ai constaté qu'il faut partir de solutions étendues et stériles de méthémoglobine; car les solutions fortes

<sup>1)</sup> S. Torup: Om Blodets Kulsyrebinding, p. 46, courbe 7, Copenhague 1887

<sup>2)</sup> Zeitschrift f. physiol. Chemie, vol. III, p. 9.

empêchent la stérilisation et favorisent soit la dessiccation, puisqu'il faut les employer en couches minces pour obtenir une modification passablement rapide, soit l'action destructive des bactéries. J'ai donc procédé comme suit: 1800<sup>cc</sup> d'une solution de méthémoglobine à environ 0,2 % furent passés au filtre Chamberland, répartis en six bouteilles coniques stérilisées et exposés à la lumière du soleil. Au bout de cinq jours, la totalité de la méthémoglobine était passée à l'état de photométhémoglobine. Là-dessus on fit subir à la solution une forte évaporation, en employant un bain-marie légèrement chauffé, la succion continue d'une puissante pompe hydraulique à air et une allonge refroidie à la glace. L'évaporation eut lieu, sans que la température du liquide dépassât 25°. Alors on traita par la force centrifuge environ 100<sup>cc</sup> de la solution qui restaient; un dosage à sec donna 2,69 %. La solution fut refroidie à 0°, et, additionnée d'environ  $\frac{1}{6}$  de volume d'alcool à la glace, passa dans un mélange réfrigérant. Le lendemain on ajouta une minime quantité d'alcool et l'on renouvela le mélange réfrigérant. Le troisième jour, il y avait des cristaux qui, au microscope, affectaient la forme de prismes allongés, assez minces et groupés en paquets et faisceaux, ayant tout à fait le même aspect que l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine cristallisées en prismes. Les cristaux avaient une couleur claire, jaune-brun, à peu près celle des cristaux de méthémoglobine. On ne vit aucune trace de précipité amorphe. Les cristaux furent lavés à l'alcool étendu et furent dissous dans de l'eau. Cette solution donna le spectre qui caractérise la photométhémoglobine.

J'ai en outre examiné si, à l'instar de l'oxyhémoglobine, la photométhémoglobine forme des combinaisons dissociables avec l'oxygène, et j'ai employé à cet effet la même solution que pour obtenir les cristaux (2,69 % de produits secs). A 18°, 65, 49<sup>cc</sup>, 7 de la solution furent secoués dans un air atmosphérique exempt d'acide carbonique, et purgés d'air à la pompe Hagen.

Analyse d'air à la Bunsen :

Après  $KOH$  . . . . . 0,972 cent. cub.

Après  $H_2$  . . . . . 5,767 " "

Après l'explosion . . . . . 4,826 " "

c.-à-d.  $O_2$  —  $0^{\text{cc}},314$   $N_2$  —  $0^{\text{cc}},655$ .

Aux mêmes température et pression (barom.  $751^{\text{mm}}$ ),  $49^{\text{c}},7$  d'eau<sup>1)</sup> secoués dans l'air atmosphérique absorberont

$O_2$  —  $0^{\text{cc}},328$   $N_2$  —  $0^{\text{cc}},637$ .

Ceci fait voir que la photométhémoglobine ne forme avec l'oxygène aucune combinaison capable à céder à l'aspiration d'une pompe, et qu'une solution de photométhémoglobine absorbe autant d'oxygène que l'eau.

De ce qu'on a dit ci-dessus, il ne ressort pas que la photométhémoglobine résulte d'une décomposition, ou qu'elle soit une modification de l'hémoglobine. La transformation de la méthémoglobine en photométhémoglobine ayant lieu sans précipité, et le type cristallin de ces deux substances étant le même, les probabilités sont en faveur de la dernière hypothèse, celle-ci pouvant se prouver directement, puisque la photométhémoglobine peut redevenir méthémoglobine. Si l'on remplit d'une solution de photométhémoglobine une bouteille, en n'y laissant que très peu d'air; si l'on y ajoute un puissant agent de réduction (j'ai employé à cela le sulfhydrate de zinc dissous qui sert à absorber l'oxygène dans les analyses de l'air par la méthode Petterson), et qu'on secoue cette bouteille, la solution de photométhémoglobine pâlit, et la raie d'absorption se déplace vers la partie rouge du spectre: la photométhémoglobine s'est

---

<sup>1)</sup> Bohr & Bock: Détermination de l'absorption de quelques gaz dans l'eau à des températures comprises entre  $0^{\circ}$  et  $100^{\circ}$ . Extrait du Bulletin de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark 1891, p. 84.

changée en hémoglobine réduite. Que maintenant on agite à l'air cette solution, il se produira de l'oxyhémoglobine qui, additionnée de cyanoferrure de potassium, prend les caractères de la méthémoglobine. L'hémoglobine a donc parcouru la série que voici: oxyhémoglobine — méthémoglobine — photométhémoglobine — hémoglobine réduite — oxyhémoglobine — méthémoglobine. En outre, j'ai vu une solution de photométhémoglobine, abandonnée dans une bouteille bouchée, passer par voie de putréfaction à l'état d'hémoglobine réduite qui, agitée à l'air, donna de l'oxyhémoglobine, dont, à son tour, et comme on l'a vu plus haut, la méthémoglobine provint facilement.

La photométhémoglobine ayant tant de facilité à provenir de la méthémoglobine et cette transformation s'opérant sans consommation d'oxygène; de plus, ces substances étant transformables par les mêmes moyens en hémoglobine réduite, on est tout près d'admettre que la photométhémoglobine contient la même quantité d'oxygène fixé que la méthémoglobine dont elle provient.

Un résultat ressortant de la présente étude, c'est que la lumière du soleil transforme la méthémoglobine en photométhémoglobine, qui ne revient pas à son premier état à l'abri de la lumière, se cristallise comme l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine, et ne forme aucune combinaison dissociable avec l'oxygène. La couleur de la solution est rouge sombre. Le spectre consiste en une seule raie d'absorption dans le vert, ayant son milieu  $\lambda = 535$ . Les réactions tant acidules qu'alcalines ne modifient pas ce spectre; les agents réducteurs puissants ou la putréfaction transforment la photométhémoglobine en hémoglobine réduite.

Autant il est aisé de reconnaître la photométhémoglobine isolée, autant elle est difficile à démêler d'avec l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine, qui en masquent très facilement la cou-

leur et le spectre. Si l'on néglige d'opérer à l'abri de la lumière pour préparer et conserver la méthémoglobine, il s'y formera aisément de la photométhémoglobine.

Il n'est pas probable que la photométhémoglobine se trouve normalement dans l'organisme; mais en revanche, il est possible qu'elle puisse s'y trouver en des états pathologiques dans lesquels le sang contient de la méthémoglobine.

