

F. LIPMANN discovered¹ that as intermediate acetyl-phosphate was formed, the phosphate group was taken up from inorganic phosphate and attached to the carbonyl group in the same way as in 1,3-phosphoglyceric acid. Because this enzyme has not yet been obtained in pure state and flavine protein and possibly diphosphopyridinenucleotide are also components of the system, it cannot be stated definitely whether these oxidations are one step reactions or not. Even in the case where the final decomposition of pyruvate is achieved by the way of synthetic reactions involving the tricarboxylic acid cycle of KREBS, cocarboxylase is a necessary component of the system.

The characteristic feature which we have already encountered with the other coenzymes, the adenylic system and cozymase, is likewise true for cocarboxylase: viz. the exact specificities of the reactions are bound to the enzyme proteins while the coenzymes exhibit only a sort of class specificity, as H₂ transporting, phosphate transferring, or decarboxylating agents. This is also true for other coenzymes like riboflavin or pyridoxal, etc.

Conclusions

Carbohydrate metabolism furnishes some very striking examples of the biological function of vitamins and hormones. As is now more and more revealed by the studies of intermediary metabolism, vitamins must be generally regarded as constituents of the effective groups of enzymes or coenzymes. Nicotinamide, the pellagra vitamin, is the reacting group of the cozymase, thiamin of the cocarboxylase, and adenylic acid plays also some role as a sort of vitamin. Quite recently it was found by LIPMANN and his group² that pantothenic acid (dihydroxydimethylbutyryl-β-alanide), another B-vitamin, is a constituent of the coenzyme of acetylation and acetate oxidation. In this way a great part

of the acetic acid arising during the oxidation of carbohydrate and fat is disposed of.

Hormones on the other hand combine with enzymes, forming compounds of an increased or diminished activity, thereby controlling or regulating the speed of turnover of the metabolites. This is exemplified by the role of the cortical hormone and insulin on hexokinase.

It should therefore be acknowledged that the approach to intermediary metabolism described here, which tries to separate the global metabolic reaction into its constituting elements and to study the behavior and kinetics of the individual enzymatic steps, is not only of theoretical or academic interest but has yielded also results of great practical importance for general medicine, agriculture, and nutrition.

Résumé

Le schéma des étapes du dédoublement des glucosides dans la glycolyse des tissus animaux est exposé ici conformément aux résultats obtenus de 1932 à 1939. Toutes les substances intermédiaires sont phosphorylées. La transphosphorylation s'accomplice selon le système adénylique (acides adénosinetri-, di- et monophosphoriques). La grande énergie libre de ce groupe phosphorique n'est pas perdue, mais transmise aux intermédiaires de la glycolyse et s'accumule dans la phosphocréatine. Un autre type de phosphorylation est représenté par la phosphorolyse réversible du glycogène, avec formation du glucose-1-phosphate. Ce type est en réalité une «transglucosidation» comme on peut le démontrer dans la formation semblable du disaccharide à partir du glucose-1-phosphate et de la lévulose. En l'absence de la lévulose, le glucose-1-phosphate réagit avec l'enzyme en proportion stœchiométrique, et conserve l'énergie du groupe phosphorique dans la combinaison du glucose avec l'enzyme.

L'article traite des nombreuses réactions enzymatiques des enzymes purifiées et cristallisées et discute plus en détail la fonction des trois enzymes, soit: la transformation de l'acide 2-phosphoglycérique en phosphoénopyruvique par l'énolase, la phosphorylation de la glucose par l'adénosinetriphosphate en présence de l'hexokinase, et le dédoublement de l'acide pyruvique par la carboxylase. Le rôle des vitamines comme groupes essentiels des coenzymes, et celui des hormones comme activateurs et inhibiteurs des enzymes sont mis en évidence dans les réactions métaboliques des glucosides.

¹ F. LIPMANN, J. Biol. Chem. 134, 463 (1940).

² F. LIPMANN, N. O. KAPLAN, G. D. NOVELLI, L. C. TUTTLE, and B. M. GUIRARD, J. Biol. Chem. 167, 869 (1947). — F. LIPMANN and G. D. NOVELLI, Arch. Biochem. 14, 23 (1947).

La biologie des hématinoprotéides oxygénables¹

Par MARCEL FLORKIN², Liège

On trouve dans toutes les cellules aérobies une série de biocatalyseurs de la famille des hématinoprotéides: les trois cytochromes, la peroxydase, la catalase. Souvent aussi, on y trouve la substance que KEILIN appelle «unspecific cell hematin». Selon STERN et MELNICK³

les cellules aérobies contiennent un autre enzyme hématinoprotéidique, «l'enzyme de la réaction de Pasteur» qui catalyse l'action inhibitrice de l'oxygène sur la fermentation et la glycolyse.

Ces différentes substances fonctionnelles interviennent dans des processus biochimiques mettant primordialement en jeu la liaison chimique existant entre deux atomes d'oxygène, que ces atomes soient liés entre eux comme dans la molécule d'oxygène, ou

¹ Conférence principale, présentée à la Société suisse de biologie médicale lors de la 127^e Assemblée générale de la Société helvétique des sciences naturelles à Genève, le 31 août 1947.

² Laboratoires de biochimie de l'Université de Liège.

³ K. G. STERN et J. L. MELNICK, J. biol. Chem. 139, 301 (1941).

qu'ils le soient sous la forme d'un pont peroxydique.

En dernière analyse, la fonction de ces biocatalyseurs relève de l'action catalytique de l'atome de fer qu'ils contiennent.

Si on considère par exemple le système cytochrome-cytochrome oxydase, on voit qu'il met en jeu l'oxygène d'une manière très fugace dans le métabolisme aérobie. Le rôle de l'oxygène est de faire passer à l'état ferrique le fer ferreux de la cytochrome oxydase. Ce fer ferrique en combinaison hématinoprotéidique amorce le transfert d'électrons qui se déroule sur la série des cytochromes. Parallèlement, l'enzyme de la réaction de Pasteur est aussi oxydé par l'oxygène moléculaire et le fer qu'il contient, de ferreux devient ferrique. Il agit alors sur le système enzymatique de la fermentation, vraisemblablement avec l'intervention d'une série d'hématinoprotéides. La fonction de l'oxygène dans les cellules aérobies consiste donc dans l'accomplissement du passage à l'état ferrique du fer de la cytochrome oxydase et de celui de l'enzyme de la réaction de Pasteur.

Il est généralement admis que cette oxydation débute par un stade d'oxygénéation très fugace, préliminaire au changement de valence du fer. On trouve aussi chez les êtres vivants une substance fonctionnelle qui est, comme la catalase, comme la peroxydase et la cytochrome oxydase un dérivé hématinoprotéidique du protohème et qui est douée d'une propriété très remarquable: celle de s'oxygénérer réversiblement, sans qu'il y ait oxydation du fer de la molécule. On peut en somme concevoir ce nouvel hématinoprotéide comme une substance acquise dans l'évolution à partir d'un catalyseur d'oxydation. Les propriétés nouvelles sont ici la protection contre l'oxydation, le premier stade seul de l'intervention de l'oxygène, ou oxygénéation, subsistant, et la stabilisation de l'oxygénéation. Ces propriétés que possèdent les hémoglobines (ou hématinoprotéides oxygénables dérivées du protohème) se retrouvent chez d'autres substances naturelles: les chlorocruorines, les hémocyanines et les hémérythrines. Les premières sont très voisines des hémoglobines et n'en diffèrent que par la possession d'un autre hème, le chlorocruorohème. Quant aux hémocyanines et aux hémérythrines, elles ne sont pas des hématinoprotéides. Elles ont cependant dans leur molécule, comme toutes les substances fonctionnelles intervenant dans les processus mettant en jeu l'oxygène, des atomes métalliques: cuivre pour l'hémocyanine et fer pour l'hémérythrine. Dans le langage de la biochimie comparée¹, on dira que les hémoglobines, les chlorocruorines, les hémocyanines et les hémérythrines sont analogues: leur propriété commune, celle de l'oxygénéation réversible est en effet mise à profit à maintes reprises au cours de l'évolution animale dans une fonction physiologique déterminée: celle du transport de l'oxygène. On dira d'autre part que les hémoglobines, les chlorocruorines,

les catalases, les peroxydases, les cytochrome oxydases, les cytochromes, les enzymes de la réaction de Pasteur sont homologues: quelle que soit la diversité de leurs rôles fonctionnels, elles sont en effet chimiquement parentes, étant toutes des hématinoprotéides.

Leurs degrés d'homologie diffèrent d'ailleurs.

Le présent exposé a pour sujet particulier l'étude des hématinoprotéides oxygénables: hémoglobines et chlorocruorines, et particulièrement leur rôle biologique en tant que transporteurs d'oxygène.

Les hémoglobines, ou hématinoprotéides oxygénables dérivées du protohème, ne sont pas l'apanage exclusif des animaux. On trouve en effet de l'hémoglobine chez un Protozoaire cilié, *Paramaecium* (SATO et TAMIYA¹) et dans les nodules des racines de légumineuses (KUBO², KEILIN et WANG³).

Chez les animaux, on a maintes fois mis l'hémoglobine en évidence en dehors du sang⁴. On a, par exemple décelé l'hémoglobine dans le système nerveux de certains Vers, tels que l'Annélide *Aphrodisia*, et d'une série de Némertiens: *Polia*, *Meckelia* et *Borlatia*.

Parmi les Insectes on trouve l'hémoglobine dans des tissus de Diptères et d'Hémiptères. Chez le Diptère *Gastrophilus intestinalis*, qui, au cours de sa période larvaire, est un parasite de l'estomac du cheval, la jeune larve est uniformément rouge par suite de la coloration, due à l'hémoglobine, du corps adipeux, des muscles pariétaux et de l'hypoderme. Dans la suite de la croissance de la larve, l'hémoglobine se localise dans des cellules spéciales, les cellules trachéennes, formant une masse rouge localisée au niveau du tiers postérieur du corps⁵.

On trouve l'hémoglobine chez certains Hémiptères tels que *Buenoa margaritacea*⁶ et *Anisops producta*⁷ où elle est aussi localisée dans des masses composées de cellules trachéennes. En outre, chez un autre Hémiptère, *Macrocrixa geoffroyi*, on trouve de l'hémoglobine dans les glandes accessoires du système génital mâle⁸.

Les muscles des Vertébrés contiennent de l'hémoglobine, à laquelle on donne souvent le nom de myoglobine et le pigment respiratoire peut aussi être mis en évidence dans les muscles pharyngiens d'une série de Mollusques gastéropodes (*Paludina*, *Littorina*, *Limnaea*, *Patella*, *Chiton*, *Aplysia*), comme aussi dans la paroi du corps de l'*Ascaris lumbricoides*⁹.

La présence d'hémoglobine dans le sang est un caractère général des Vertébrés: elle est toujours chez eux contenue dans des hématies, nucléées ou anucléées.

¹ T. SATO et H. TAMIYA, Cytologia (Fujii Jub. Vol.) 11:33 (1937).

² H. KUBO, Acta phytoch. 11, 195 (1939).

³ D. KEILIN et Y. L. WANG, Nature 155, 227 (1945).

⁴ Littérature, voir: M. FLORKIN, Transporteurs d'oxygène (Hermann, Paris 1934).

⁵ D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946).

⁶ H. B. HUNGERFORD, Canad. Entom. 54, 262 (1922). — C. O. BARE, Kansas Univ. Sci. Bull. 18, 265 (1928).

⁷ R. POISSON, Arch. Zool. exp. et gén. 65, 182 (1926).

⁸ M. D. HAVILAND-BRINDLEY, Trans. Entom. Soc. London 77, 5 (1929).

⁹ D. KEILIN, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 98, 312 (1925).

La distribution de l'hémoglobine dans le sang des Invertébrés, où elle est, soit contenue dans des hématies, soit dissoute, défie toute systématisation. Passons en revue les différents groupes d'Invertébrés¹.

Chez les Echinodermes, on a chez une Ophiuroïde et chez de nombreuses Holothurioïdes mis en évidence, soit dans un des liquides organiques, soit dans deux ou soit dans les trois, des hématies à hémoglobine. On n'a jamais trouvé d'hématies chez des Stelleroïdes ou chez des Echinoïdes, ni chez des Holothurioïdes à test.

L'existence d'une hémoglobine dans le sang ou le liquide cœlomique des Vers annelés est connue depuis longtemps. Chez les Polychètes, il existe généralement un système circulatoire dans lequel on trouve un sang rouge, contenant de l'hémoglobine dissoute (*Arenicola*, *Eunice*, *Cirratulus*, *Nereis*, *Nais*, *Ophelia*, *Marphysa*, etc.). Le sang est cependant incolore chez les Phyllodociens, les Syllidiens et les Chétoptériens. Il n'existe pas de cas connu de la présence dans le sang d'une Annélide, d'un transporteur d'oxygène intracellulaire. Mais quand il existe de l'hémoglobine dans le liquide cœlomique d'une Annélide, le transporteur d'oxygène est toujours contenu dans des hématies. C'est le cas pour une série de Polychètes dépourvus de système circulatoire, tels que les Capitelliens, les Glycériens et le Térébellien *Polybirrus hematodes*. Chez d'autres Térébelliens comme *Travisia forbesii* ou *Terebella lapidaria*, il existe à la fois de l'hémoglobine dissoute dans le sang et de l'hémoglobine contenue dans des hématies cœlomiques. Parmi les Oligochètes, le sang contenu dans le système circulatoire est incolore chez les Enchytræides. Il contient de l'hémoglobine dissoute chez beaucoup d'autres Oligochètes : *Lumbricus*, *Tubifex*, *Limnodrilus*, *Lumbriculus*, etc. Quant aux Hirudinés, on trouve de l'hémoglobine dissoute dans le sang des Gnathobdellides (*Hirudo*, *Aulastoma*, *Nephelis*, etc.) tandis que le sang est incolore chez les Rhynchobdellides (*Pontobdella muricata*, *Branchiobdella astaci*, etc.).

Chez les Vers némiertiens ou turbellariés, on trouve parfois dans le sang des hématies à hémoglobine (*Derostoma*, *Syndesmis*, *Drepanophorus*, *Polia*).

Les Echiuriens sont parfois considérés comme des Vers aberrants. Cependant, ils ne sont pas segmentés, ils ne portent qu'un petit nombre de soies disposées tout autrement que chez les Annélides et ils ont le corps divisé en deux parties, le lobe préoral rétractile et le corps proprement dit. On trouve dans la cavité cœlomique de beaucoup d'Echiuriens des hématies nucléées contenant de l'hémoglobine. Le liquide cœlomique des Echiuriens est d'ailleurs le seul liquide de leur milieu intérieur : ils sont dépourvus de système circulatoire.

Parmi les Mollusques, on trouve des hématies à hémoglobine dans le sang de nombreux Lamellibranches (appartenant aux genres *Pectunculus*, *Glycimeris*, *Cul-*

tellus, *Arca*, *Gastrana*, *Tellina*, *Solen*, *Poromya*, *Capsa*, *Astarte*, etc.) et dans le liquide cœlomique de certains Amphineures, les Néoméniens. Chez un Gastéropode, *Planorbis*, le sang contient de l'hémoglobine dissoute.

Les Arthropodes ne sont que très exceptionnellement pourvus d'hémoglobine. Chez les Crustacés, beaucoup d'espèces qui sont de petite taille sont dépourvues de transporteur d'oxygène et d'autres ont de l'hémocyanine dans le sang. C'est seulement dans le groupe des Entomostracés (*Apus*, *Branchipus*, *Artemia*, *Daphnia*, *Chirocephalus*, *Lernanthropus*, *Clavella*, *Congercola*) qu'on trouve des sangs contenant de l'hémoglobine dissoute. Quant aux Insectes, qui ont recouru, pour l'apport de l'oxygène aux cellules, au transfert direct de l'air par les trachées, leur sang est dépourvu de transporteur d'oxygène, sauf une exception très remarquable, celle du sang des larves de certains Chironomides. La nature hémoglobinique du pigment rouge dissous dans le sang de la larve du Diptère *Chironomus*, communément appelée «ver de vase» a été démontrée par ROLLET¹ dès 1861.

Sans doute les cellules sont-elles capables d'édifier des hématines. Elles contiennent toutes de nombreuses hématinoprotéides. Mais il apparaît qu'elles ne sont pas toutes capables de réaliser le mode particulier de combinaison d'un hème à une protéine qui présente les caractères assurant à la molécule résultante une protection contre l'oxydation et une stabilité de l'oxygénéation, caractères au sujet desquels les récentes recherches de PAULING et de ses collaborateurs ont apporté de suggestives données. Qu'il dépende du pouvoir de synthétiser la globine ou qu'il dépende du pouvoir de combiner la globine à un hème selon les modes particuliers à une hématinoprotéide oxygénable, le pouvoir de synthétiser l'hémoglobine est certainement apparu maintes fois dans l'évolution comme l'attestent les curiosités que représentent dans le monde de leur groupe zoologique l'hémoglobine du chironome ou celle de la planorbe.

Mais il n'est pas douteux que le mécanisme de cette synthèse fait partie de la structure biochimique de certains groupes animaux, comme les Holothurioïdes parmi les Echinodermes, les Lamellibranches parmi les Mollusques, les Entomostracés parmi les Arthropodes. Elle est en outre répandue chez les représentants de groupes animaux plus étendus, comme les Vers et les Vertébrés.

La dénomination commune d'hémoglobine comporte, chez les molécules qui reçoivent cette dénomination, une série de caractères communs et entre autres :

celui d'être dérivées du protohème, caractère qui résulte du fait que les groupements prosthétiques des diverses hémoglobines fournissent, de l'avis général, le même hémochromogène lorsqu'ils sont combinés avec une substance basique azotée déterminée;

¹ Littérature, voir: M. FLORKIN, Transporteurs d'oxygène (Hermann, Paris 1934).

¹ A. ROLLET, Unters. Z. Naturl. 8, 531 (1861).

Tableau I
(ROCHE et JEAN¹; ROCHE et MOURGUE²)
Composition moyenne en acides aminés de différentes hémoglobines

| Hémoglobine de | Tryptophane % | Tyrosine % | Cystine % | Arginine % | Histidine % | Lysine % | Leucine % | Valine % | Alanine % |
|--------------------------|---------------|------------|-----------|------------|-------------|----------|-----------|----------|-----------|
| <i>Lumbricus</i> | 4,41 | 3,47 | 1,41 | 10,07 | 4,68 | 1,73 | — | — | — |
| <i>Arenicola</i> | 1,64 | 2,52 | 4,08 | 10,04 | 4,03 | 1,85 | 9,68 | 6,69 | — |
| Cheval | 2,38 | 3,38 | 0,74 | 3,57 | 8,13 | 8,31 | 19,15 | 9,92 | 8,93 |

celui d'être de nature hétéroprotéidique, le protohème étant uni à une holoprotéine à laquelle on donne par définition le nom de globine;

celui de présenter un spectre caractéristique deux bandes à l'état oxygéné, et à une bande à l'état réduit;

celui d'être oxygénables, c'est-à-dire de contracter une combinaison stable et réversible avec l'oxygène moléculaire;

celui de se combiner avec l'oxyde de carbone pour fournir la carboxyhémoglobine, dont le spectre visible présente deux bandes dont les positions diffèrent de celles de l'oxyhémoglobine correspondante;

celui d'être, en solution purifiée, et lorsqu'elles sont oxygénées, plus ou moins lentement transformées en méthémoglobine, composé à fer trivalent, qui n'est plus oxygénable et dont les solutions présentent dans le spectre visible, une bande dont la position diffère de celle de la bande de l'hémoglobine réduite.

L'homologie affirmée par le nom générique d'hémoglobine donné aux hématinoprotéides oxygénables à base de protohème n'est pas une homologie complète, comme le montre l'examen comparatif des propriétés des différentes hémoglobines.

Outre le fait que les cristaux d'hémoglobine diffèrent d'une espèce animale à l'autre, ce qui fut le sujet d'une vaste enquête de REICHERT et BROWN³, la composition en acides aminés des différentes hémoglobines montre des différences nettes, comme l'indiquent les exemples réunis dans le tableau I.

Les belles recherches de JEAN ROCHE et de son école ont bien mis en évidence le fait que l'hémoglobine des Vertébrés se distingue nettement des autres hémoglobines par le fait qu'elle contient moins d'arginine et de cystine et plus d'histidine, de lysine et de leucine.

Les positions des deux bandes α et β du spectre de l'oxyhémoglobine sont aussi différentes. Chez les Annelides, les deux bandes sont décalées vers le violet par rapport à leurs positions chez les Vertébrés. Au contraire, chez les Holothuries, les deux bandes sont décalées vers le rouge.

Les points isoélectriques des différentes hémoglobines présentent aussi des différences, comme le montre le tableau II.

Tableau II
Points isoélectriques des hémoglobines

| | | |
|-------------------------------------|------|---|
| <i>Planorbis</i> | 4,77 | PEDERSEN ¹ |
| <i>Thyone briareus</i> . | 5,80 | SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL ² |
| <i>Nereis virrens</i> . . . | 5,10 | SVEDBERG ³ |
| <i>Arenicola marina</i> . | 4,76 | PEDERSEN ¹ |
| <i>Aphrodite aculeata</i> | 5,70 | ROCHE ⁴ |
| <i>Glycera convoluta</i> . | 5,60 | ROCHE ⁴ |
| <i>Hæmopis sanguisuga</i> | 5,01 | SVEDBERG ³ |
| <i>Lumbricus terrestris</i> | 5,28 | SVEDBERG ³ |
| <i>Chironomus plumosus</i> | 5,40 | SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL ² |
| <i>Gastrophilus intestinalis</i> | 6,20 | KEILIN et WANG ⁵ |
| Homme | 6,78 | FERRY ⁶ |
| Cheval | 6,78 | VAN SLYKE et coll. ⁷ |
| Pigeon | 7,23 | SVEDBERG ³ |

Comme on le voit, l'hémoglobine des Vertébrés a un point isoélectrique voisin de la neutralité et différent en cela de celui des hémoglobines des autres groupes, dont les points isoélectriques sont plus acides. Les hémoglobines diffèrent aussi par la valeur du poids moléculaire. Sans vouloir entrer dans le détail de la question, rappelons que les différentes hémoglobines ont des poids moléculaires qui sont approximativement des multiples d'un nombre voisin de 17000.

La valeur du multiplicateur varie d'une hémoglobine à une autre. Elle correspond à l'unité pour l'hémoglobine de la lampoie (SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL²) et l'hémoglobine musculaire des Mammifères (THEORELL⁸). Le multiplicateur est voisin de 2 dans le cas de l'hémoglobine de la larve de *Gastrophilus* (ADAIR, OGSTON et JOHNSTON⁹), de l'hémoglobine de la larve de *Chironomus* (SVEDBERG et ERIKSSON-

¹ K. O. PEDERSEN, Koll. Z. 63, 268 (1933).

² T. SVEDBERG et I. B. ERIKSSON-QUENSEL, J. Am. chem. Soc. 56, 1700 (1934).

³ T. SVEDBERG, J. biol. Chem. 103, 311 (1933).

⁴ J. ROCHE, Essai sur la Biochimie générale et comparée des pigments respiratoires (Masson, Paris s.d.).

⁵ D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946).

⁶ R. M. FERRY, J. biol. Chem. 57, 819 (1923).

⁷ D. D. VAN SLYKE, A. B. HASTINGS, M. HEIDELBERGER et J. M. NEILL, J. biol. Chem. 54, 81 (1922).

⁸ H. THEORELL, Biochem. Z. 252, 1 (1932).

⁹ G. S. ADAIR, A. G. OGSTON et J. P. JOHNSTON, Biochem. J. 40, 867 (1946).

QUENSEL¹) et de l'hémoglobine du Lamellibranche *Arca* (SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL¹). SVEDBERG et ses coll.² ont montré qu'il existe une série d'autres valeurs, plus élevées, du multiplicateur: 4 pour l'hémoglobine des Vertébrés, 24 pour celle de la daphnie, 96 pour celle de la planorbe et 192 pour les hémoglobines du lombric et de l'arénicole.

Sans doute ces données sont-elles encore trop fragmentaires pour servir de base à un chapitre de biochimie comparée.

Quoi qu'il en soit, tous les résultats concourent à faire admettre que les Vertébrés ont, de manière générale, une hémoglobine sanguine qui est caractéristique de cette classe du règne animal. Elle diffère de toutes les autres hémoglobines étudiées jusqu'à présent par le fait qu'elle contient quatre atomes de fer.

Le pouvoir d'oxygénéation reste le plus mystérieux des caractères de l'hémoglobine. L'étude approfondie des modifications intimes que les méthodes utilisées par PAULING ont permis de mettre en évidence au niveau de l'atome de fer au cours de l'oxygénéation donnera peut-être accès au mécanisme du phénomène. En attendant il ne nous reste que la ressource de caractériser le comportement des différentes hémoglobines au cours de leur oxygénéation par le graphique qui exprime le degré d'oxygénéation en fonction de la pression partielle d'oxygène et qui est familièrement connue sous le nom de courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. Si on représente par T la portion de la molécule d'hémoglobine correspondant à un groupement oxygérable, c'est-à-dire à un atome de fer, l'équilibre sera représenté par



et

$$\frac{[TO_2]}{[T]_0 \cdot [O_2]} = K, \quad (2)$$

K étant la constante d'équilibre d'oxygénéation. La concentration de l'oxygène dans la solution, $[O_2]$, étant proportionnelle à la pression partielle de l'oxygène, conformément à la loi de HENRY, on peut la remplacer dans l'équation (2) par cette pression p .

Si on représente par $[HbO_2]$ la concentration de l'hémoglobine oxygénée et par $[Hb]$ la concentration de l'hémoglobine non oxygénée, l'équation devient

$$\frac{[HbO_2]}{[Hb]} = Kp, \quad (3)$$

$$\log \frac{[HbO_2]}{[Hb]} = \log p + \log K. \quad (4)$$

La forme logarithmique est particulièrement utile car si on porte en ordonnées les valeurs de $\log \frac{[HbO_2]}{[Hb]}$ et en abscisses les valeurs de $\log p$, on aura, K étant

une constante, une ligne droite inclinée à 45° et coupant l'axe des ordonnées en un point correspondant à la valeur de $\log K$. Sous la forme habituelle, en portant en ordonnées les valeurs du pourcentage de saturation et en abscisses les pressions partielles d'oxygène, on obtiendra une hyperbole. C'est le cas pour l'hémoglo-

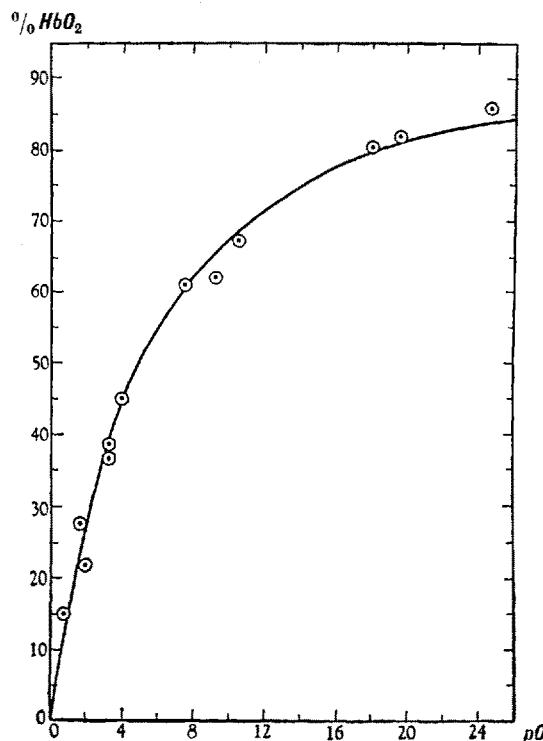


Fig. 1. (KEILIN et WANG¹) — Courbe de dissociation d'une solution concentrée ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/g d'hémateine par l) d'hémoglobine de *Gastrophilus*. Temp.: 39°.

globine musculaire des Mammifères et pour l'hémoglobine de la larve de *Gastrophilus*². Mais ce n'est pas le cas pour les autres hémoglobines qu'on a jusqu'à présent étudiées (voir fig. 2). Dans le cas le plus général, la courbe de dissociation n'est pas une hyperbole, mais une courbe sigmoïde dont on peut empiriquement exprimer la forme par l'équation bien connue:

$$\frac{[HbO_2]}{[Hb]} = K p^n$$

dans laquelle l'exposant représente, assez vaguement d'ailleurs, le degré d'interdépendance ou de diversité des différents groupes oxygénables. On admet en effet que dans les solutions d'hémoglobine musculaire des Vertébrés ou d'hémoglobine de *Gastrophilus*, il n'existe qu'une seule espèce de groupement oxygénable. L'hémoglobine musculaire ne contient qu'un atome de fer, et celle de la larve de *Gastrophilus* en contient deux, mais qui ont vraisemblablement des caractères identiques, tandis que dans les hémoglobines à courbe sigmoïde, ou bien les groupements oxygénables de la

¹ T. SVEDBERG et I. B. ERIKSSON-QUENSEL, J. Am. chem. Soc. 56, 1700 (1934).

² Voir: D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946), fig. 1.

² Voir: D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946), fig. 1.

même molécule ont des constantes d'oxygénéation différentes, ou bien l'oxygénéation de l'un d'entre eux modifie la constante d'oxygénéation de ses voisins. D'une manière générale, les courbes de dissociation des hémoglobines de Vertébrés ont une forme sigmoïde, mais le degré de ce caractère varie d'une classe à l'autre

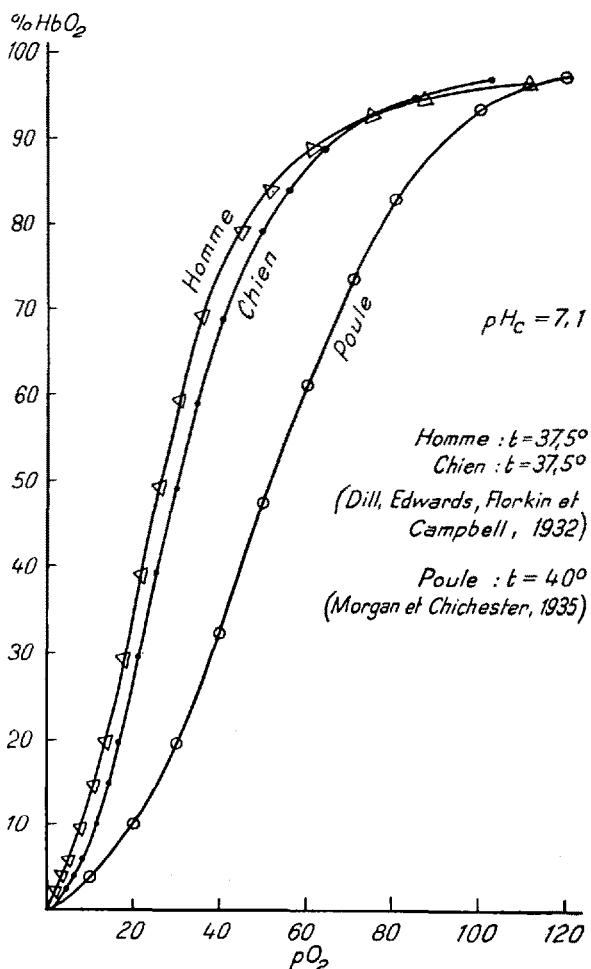


Fig. 2. (MORGAN et CHICHESTER¹) — Courbes de dissociation des hémoglobines des sanguins de l'homme², du chien² et de la poule¹.

selon un mode qui cadre avec la notion selon laquelle la courbe hyperbolique constitue un caractère primitif par rapport à la courbe sigmoïde. Chez les Poissons, en effet, les courbes de dissociation se distinguent de celles des autres sangs de Vertébrés en ce qu'elles ne sont que faiblement sigmoïdes, ou même presque hyperboliques, ou encore ondulées. Chez les Amphibiens, le même caractère s'observe chez les Urodèles, tandis que les Anoures ont des courbes nettement sigmoïdes, comme d'ailleurs les Reptiles, les Oiseaux et les Mammifères. Cette succession phylogénétique a une intéressante correspondance ontogénétique mise en évidence par McCUTCHEON³ chez *Rana catesbeiana* dont le têtard a

une hémoglobine à courbe hyperbolique et l'adulte une hémoglobine à courbe sigmoïde.

On peut se faire une idée de l'affinité particulière d'une hémoglobine déterminée pour l'oxygène en repérant la position de sa courbe de dissociation par la valeur de p_{50} , c'est-à-dire de la pression partielle d'oxygène correspondant à un degré d'oxygénéation de 50%.

Il faudra cependant comparer des valeurs de p_{50} obtenues dans des conditions comparables. Les variations de température et de p_H déplacent en effet la courbe de dissociation. La combinaison de l'oxygène moléculaire avec un transporteur étant un processus exothermique, une élévation de température diminuera l'affinité, et un abaissement de température l'augmentera. La fig. 3 illustre le déplacement de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine de la raie *Raia ocellata*¹ en fonction de la température.

L'influence des variations de pression partielle d'anhydride carbonique (p_{CO_2}) sur l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine a été découverte en 1904 par BOHR, HASSELBALCH et KROGH, et elle porte le nom d'«effet Bohr». L'influence de la variation de p_{CO_2} est la conséquence d'une variation de p_H qui entraîne des modifications de dissociation de l'hémoglobine en tant qu'amphoter, modifications qui influencent les propriétés des groupements oxygénables. Quand la p_{CO_2} augmente dans une solution alcaline d'hémoglobine, le p_H se rapproche du point isoélectrique du transporteur et la dissociation de ses groupements acides diminue. L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène diminue aussi et la valeur de p_{50} augmente, puisque la courbe de dissociation se déplace vers la droite. La fig. 4 illustre le phénomène dans le cas de l'hémoglobine de cheval. L'intensité de l'effet Bohr étant très variable, il faudrait, pour comparer les affinités pour l'oxygène des diverses hémoglobines, pouvoir disposer de courbes de dissociation obtenues dans des conditions comparables de p_H et de température. Ces conditions n'ont pas encore pu être réalisées de manière satisfaisante, car la variation de p_{CO_2} affecte le p_H du sang ou d'une solution d'hémoglobine de manières différentes, et la courbe de dissociation est dans chaque cas déplacée de manière particulière en fonction du p_H . La variation d'affinité en fonction de la température diffère aussi, pour les solutions d'hémoglobine, selon les conditions du milieu et selon la nature de l'hémoglobine. En attendant que des données plus précises soient mises à notre disposition, nous pouvons cependant arriver à des conclusions intéressantes en partant de certaines données de la littérature.

Parmi les hémoglobines connues, celle qui a la plus grande affinité pour l'oxygène est certainement celle du liquide périnentérique d'*Ascaris lumbricoides*. Comme KEILIN² l'a montré, l'ascaris possède deux hémoglo-

¹ V. E. MORGAN et D. F. CHICHESTER, J. biol. Chem. 110, 285 (1935).

² D. B. DILL, H. T. EDWARDS, M. FLORKIN et R. W. CAMPBELL, J. biol. Chem. 95, 143 (1932).

³ F. H. McCUTCHEON, J. cell. and comp. Physiol. 8, 63 (1936).

¹ D. B. DILL, H. T. EDWARDS et M. FLORKIN, Biol. Bull. 62, 23 (1932).

² D. KEILIN, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 98, 312 (1925).

bines, l'une dans la paroi du corps et l'autre dans le liquide périnentérique. Ces deux hémoglobines diffèrent l'une de l'autre par les caractères de leurs spectres d'absorption, tous deux différents, d'ailleurs, de celui de l'hémoglobine du porc. Dans une étude récente, DAVENPORT¹ a mis en évidence la très forte affinité

par litre est de 0,02 mm Hg. La nouvelle complication rencontrée ici, et qui est la variation d'affinité avec le degré de dilution de l'hémoglobine s'observe aussi pour différentes hémoglobines de Mammifères¹.

Fox² a comparé les valeurs de p_{50} , à 10° et à 17° et en l'absence de CO₂, pour les sangs non dilués de la

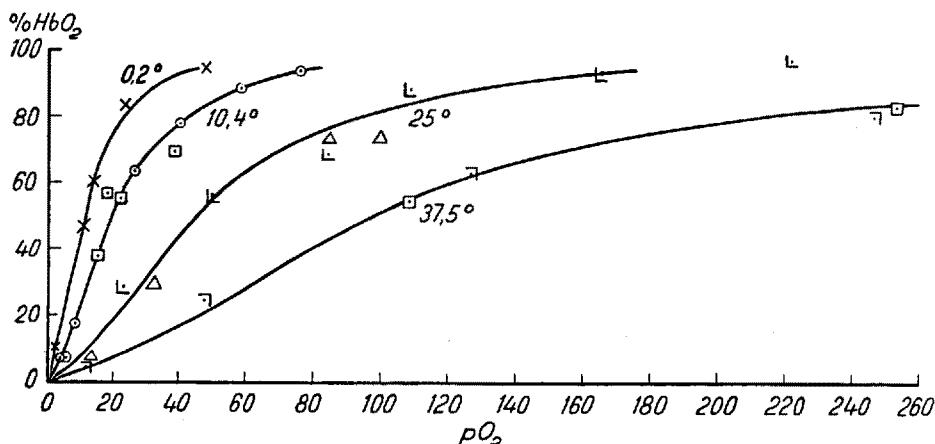


Fig. 3. (DILL, EDWARDS et FLORKIN²) — Courbes de dissociation de l'hémoglobine du sang de la raie *Raia ocellata* à différentes températures ($\rho\text{CO}_2 = 1 \pm 0,5$ mm Hg).

des hémoglobines d'*Ascaris* pour l'oxygène: l'hydro-sulfite de sodium ne les réduit que très lentement, et une ébullition dans le vide à 20° ne les réduit pas complètement.

L'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine de la larve de *Gastrophilus* est moindre. A 39°, la p_{50} d'une solution concentrée contenant $1 \cdot 10^{-3}$ atome/g de Fe par litre correspond à 4,9 mm, tandis que la p_{50} d'une solution diluée contenant $0,84 \cdot 10^{-4}$ atome/g de Fe

larve de *Chironomus*, de l'arénicole et de la planorbe, et pour les sangs à peine dilués de *Tubifex*, de *Daphnia* et de *Ceriodaphnia*. Il a obtenu les résultats réunis dans le tableau III:

Tableau III

| | p_{50} | |
|---|----------|-----|
| | 10° | 17° |
| <i>Chironomus riparius</i> | 0,5 | 0,6 |
| <i>Tubifex</i> sp. | 0,5 | 0,6 |
| <i>Ceriodaphnia laticaudata</i> | — | 0,8 |
| <i>Arenicola marina</i> | 1,5 | 1,8 |
| <i>Planorbis corneus</i> | 1,5 | 1,9 |
| <i>Daphnia magna</i> | 2,0 | 3,1 |

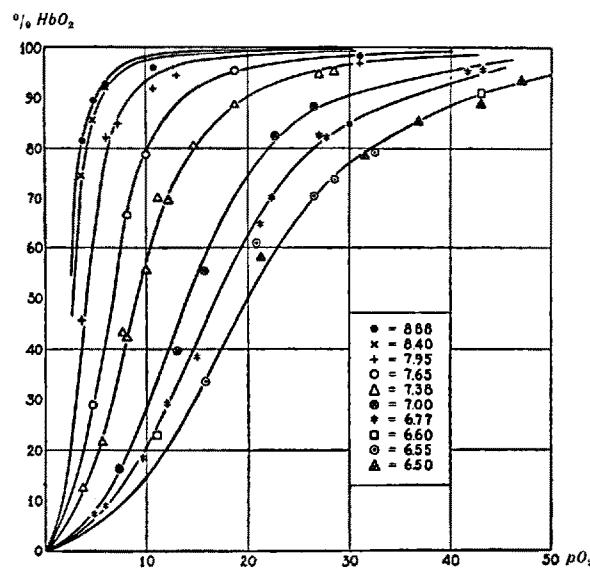


Fig. 4. (FERRY et GREEN³) — Influence des variations de ρH sur la courbe de dissociation de l'hémoglobine du sang de cheval.

¹ H. E. DAVENPORT, Nature 155, 516 (1945).

² D. B. DILL, H. T. EDWARDS et M. FLORKIN, Biol. Bull. 62, 23 (1932).

³ R. M. FERRY et A. A. GREEN, J. biol. Chem. 81, 175 (1929).

Les hémoglobines du chironome et de *Tubifex* ont, dans cette série, l'affinité la plus forte et celle de la daphnie l'affinité la plus faible. On peut comparer les valeurs de la deuxième colonne du tableau avec la valeur de p_{50} qui est de 27 mm¹ pour le sang humain à sa concentration normale en hémoglobine, à la température de 20° et au ρH 7,4. On voit donc que l'affinité de l'hémoglobine des Invertébrés pour l'oxygène apparaît comme nettement plus forte que celle de l'hémoglobine humaine.

McCUTCHEON et HALL³, HALL et McCUTCHEON⁴ et

¹ R. HILL et H. P. WOLVEKAMP, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 120, 484 (1936).

² H. M. FOX, J. exp. Biol. 21, 161 (1945).

³ F. H. McCUTCHEON et F. G. HALL, J. cell. and comp. Physiol. 9, 191 (1937).

⁴ F. G. HALL et F. H. McCUTCHEON, J. cell. and comp. Physiol. 11, 205 (1938).

McCUTCHEON¹ ont comparé les valeurs de p_{50} correspondant à des solutions diluées d'hémoglobine dans des solutions-tampons de phosphates de p_H défini, à une température définie, et leurs résultats montrent que l'affinité pour l'oxygène est moindre pour les hémoglobines des animaux à respiration terrestre que pour celles des animaux aquatiques et que d'autre part elle est aussi moindre chez les espèces très actives que chez les peu actives. Le même procédé permet de montrer que chez les espèces à respiration aérienne, l'affinité est plus grande dans la vie embryonnaire que chez l'adulte: c'est le cas chez la chèvre², chez le poulet³, chez la grenouille *Rana catesbeiana*⁴ et chez la tortue *Malaclemys centrata*¹.

L'ensemble des données acquises est en faveur de la notion selon laquelle les hémoglobines à affinité faible pour l'oxygène sont des transporteurs plus évolués que les hémoglobines à affinité forte.

Les différents hémoglobines diffèrent aussi sous le rapport des variations d'affinité pour l'oxygène en fonction du p_H (effet Bohr). Certaines hémoglobines ne présentent pas d'effet Bohr: telles sont l'hémoglobine d'*Urechis*⁵, celle de la larve de *Chironomus*⁶ et l'hémoglobine musculaire des Vertébrés⁷. Pour les hémoglobines d'autres Invertébrés que ceux qui viennent d'être cités, l'effet est très faible (*Ceriodaphnia laticaudata*, *Thalassema neptuni*, *Arenicola marina*, *Planorbis corneus*, *Daphnia magna*, Fox⁶, *Arenicola marina*, WOLVEKAMP et VREEDE⁸). Il existe à des degrés plus ou moins marqués chez les différentes classes de Vertébrés et joue chez eux un rôle important que nous aurons à considérer. Dans l'ensemble, l'acquisition de l'effet Bohr apparaît comme un fait d'évolution de l'hémoglobine. Son intensité, de même que l'affinité particulière de l'hémoglobine pour l'oxygène, et la forme de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine, apparaît comme un caractère spécifique de chaque transporteur, intégré dans le mécanisme respiratoire de l'animal qui le possède.

Les hémoglobines diffèrent encore l'une de l'autre par d'autres caractères. Si pour chaque hémoglobine on mesure en unités Å l'espace (*span*) qui sépare, dans le spectre d'absorption, la position de la bande α de l'oxyhémoglobine de celle de la bande α de la carboxy-hémoglobine, on observe des différences nettes.

D'autre part, l'autoxydation des hémoglobines en méthémoglobin qui est très lente dans le cas des hémoglobines de Vertébrés est beaucoup plus rapide dans le cas de l'hémoglobine de *Gastrophilus*, de l'hémoglo-

bine musculaire des Mammifères ou de l'hémoglobine des nodules de racines des Légumineuses.

KEILIN et WANG¹, qui attirent l'attention sur ces différences dans leur beau mémoire sur l'oxyhémoglobine de *Gastrophilus* font remarquer que ce caractère, associé au fait que les trois hémoglobines en question ont aussi une très forte affinité pour l'oxygène, une faible affinité pour l'oxyde de carbone, une faible valeur² du coefficient K de l'équation $\frac{[HbCO]}{[HbO_2]} \frac{p_{CO}}{p_{CO_2}} = K$ et une localisation intracellulaire étrangère au milieu intérieur, en fait en quelque sorte des intermédiaires entre certains catalyseurs d'oxydation et les transporteurs d'oxygène les moins autoxydables.

Le rapide tableau que nous avons brossé de la biochimie comparée des hémoglobines aura montré qu'elles constituent un domaine dans lequel s'affirment à l'échelle moléculaire les différences systématiques qui distinguent les groupes animaux. Les hémoglobines des Vertébrés, jusqu'à présent les mieux étudiées, présentent des différences d'une espèce à l'autre et même, à ce qu'il semble, d'un individu à l'autre. On peut cependant, à certains caractères biochimiques, distinguer une hémoglobine de Vertébré des autres hémoglobines, en particulier par le fait qu'elle a un poids moléculaire voisin de 68000, caractère qui apparaît comme aussi typique des Vertébrés que les caractères morphologiques que les systématiciens leur attribuent en propre.

Typiquement, la fonction respiratoire d'un milieu intérieur s'accomplit au cours d'un cycle au cours duquel ce milieu intérieur circule au sein de l'organisme depuis le lieu de sa mise en équilibre avec le milieu extérieur, ou avec un prolongement de ce dernier pénétrant au sein de l'organisme, jusqu'aux cellules des différents tissus.

Au niveau de la frontière du milieu extérieur, le sang se charge d'oxygène et abandonne de l'anhydride carbonique. Au niveau des tissus, il abandonne de l'oxygène et se charge d'anhydride carbonique. Ce cycle respiratoire typique implique l'intervention d'un système physico-chimique qui assure le transport de l'oxygène dans une direction et le transport de l'anhydride carbonique dans l'autre.

Les propriétés de l'hémoglobine mises en jeu dans son intervention au cours du fonctionnement du système transporteur sont multiples. Elle est oxygénable et son degré d'oxygénation varie en fonction de la pression partielle d'oxygène. Etant une hétéroprotéide, elle porte des groupements acides qui peuvent se combiner avec des bases, la dissociation de ces groupements acides étant fonction de la réaction du milieu et la

¹ F. H. McCUTCHEON, J. cell. and comp. Physiol. 29, 333 (1947).

² E. F. McCARTHY, J. Physiol. 80, 206 (1933). — F. G. HALL, J. Physiol. 82, 33 (1934).

³ F. G. HALL, J. Physiol. 83, 222 (1934).

⁴ F. H. McCUTCHEON, J. cell. and comp. Physiol. 8, 63 (1936).

⁵ A. C. REDFIELD et M. FLORKIN, Biol. Bull. 61, 185 (1931).

⁶ H. M. FOX, J. exp. Biol. 21, 161 (1945).

⁷ R. HILL, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 120, 472 (1936).

⁸ H. P. WOLVEKAMP et M. C. VREDE, Arch. néerl. Physiol. 25, 265 (1940/41).

¹ D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946).

² Les valeurs de K sont respectivement les suivantes pour une série de transporteurs et de biocatalyseurs: Hb de Vertébrés: 120-550; Hb musc. de rat: 28-51; Hb des légumineuses: 37; Hb de *Gastrophilus*: 0,67; Phénoloxydase: 0,25-1,00; Cytochrome oxydase: 0,1. — D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946).

molécule abandonnant des cations lorsque le p_H se rapproche du point isoélectrique. La dissociation ne varie pas seulement avec la réaction mais aussi avec le degré d'oxygénéation et, inversement, le degré d'oxygénéation pour une pression partielle d'oxygène donnée varie avec la dissociation des groupements acides voisins des groupements oxygénables. D'autre part, la molécule du transporteur contient des groupements NH₂ libres et ces derniers peuvent contracter avec l'acide carbonique des combinaisons du type carbamate.

Tels sont les caractères qui font de l'hémoglobine une substance fonctionnelle particulièrement intéressante. Il importe de rendre tangibles, par des exemples concrets, ces caractères importants, avant de montrer quel parti a pu en être tiré au cours de l'évolution de la fonction respiratoire du milieu intérieur, et tout d'abord dans le transport de l'oxygène.

Si on représente graphiquement l'absorption de l'oxygène combiné en fonction de la pression partielle de ce gaz, pour différents sangs ou liquides céloïques pourvus d'un transporteur d'oxygène, les conditions en ce qui concerne la température et la pression partielle d'anhydride carbonique étant celles qui existent dans le sang artériel, on obtient un graphique comme celui

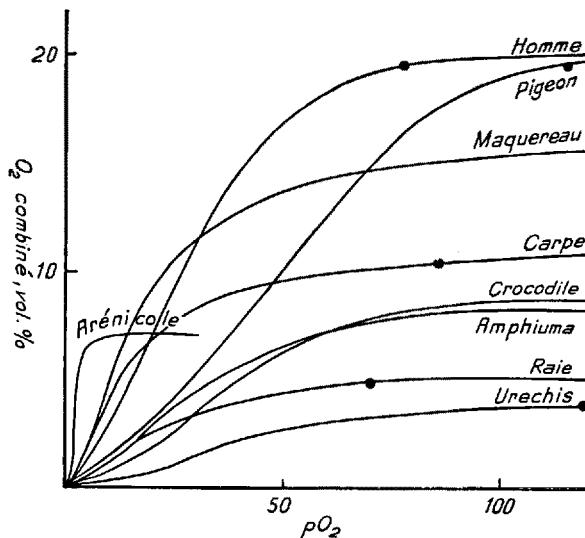


Fig. 5. (FLORKIN¹) - Courbes d'absorption de l'oxygène par différents sangs et liquides céloïques contenant de l'hémoglobine, dans les conditions «artérielles» reproduites approximativement *in vitro*. Les points noirs repèrent les valeurs de la p_{O_2} artérielle.

de la fig. 5. Ces courbes sont très différentes, mais une des causes de cette variété est le fait que le nombre de groupements oxygénables varie d'un milieu intérieur à l'autre. Le pouvoir oxyphorique, c'est-à-dire la quantité d'oxygène exprimée en volumes pour cent correspondant à la saturation du transporteur commande en effet le niveau auquel la courbe devient horizontale. Pour comparer utilement les différentes courbes, il faut considérer dans chaque cas, pour les différentes pres-

sions partielles, non plus la quantité d'oxygène combinée au transporteur, mais le degré de saturation de ce dernier. On voit alors, comme dans la fig. 6 se distribuer dans le graphique une famille de courbes dont on peut repérer la position en notant la valeur de la pression partielle d'oxygène correspondant à un degré de saturation de 50% (p_{50}). La position et la forme des courbes de la fig. 6 correspondent dans chaque cas à la tem-

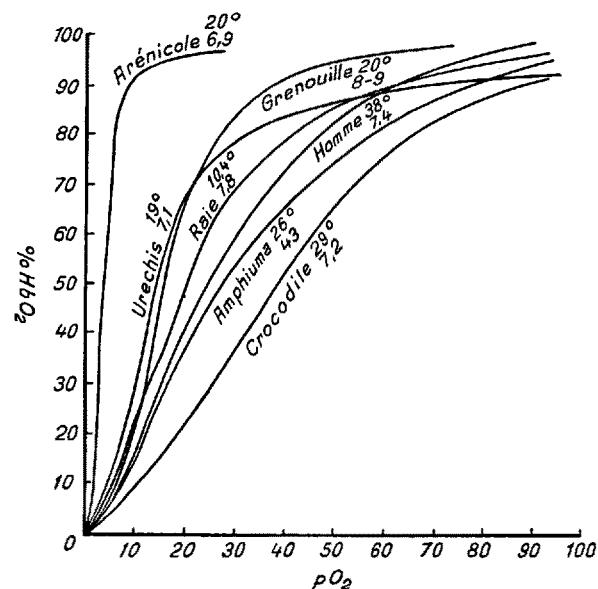


Fig. 6. (FLORKIN¹) - Courbes d'absorption de l'oxygène par différents milieux intérieurs contenant de l'hémoglobine. On a indiqué dans chaque cas la température et la pression partielle d'anhydride carbonique (dans les cas de la grenouille et d'*Amphiuma*) ou le p_H (dans les autres cas).

pérature et à la pression partielle de CO₂ régnant au lieu de l'artérialisation du sang. La température est de 10° dans le cas de la raie et de 38° dans celui de l'homme.

La pression partielle de CO₂ est de 8 mm dans le cas de la grenouille et de 43 mm dans le cas de l'Urodèle *Amphiuma*.

Si nous avions tracé toutes les courbes à la même p_{CO_2} et à la même température, les valeurs des p_{50} n'auraient pas été celles du graphique de la fig. 6. Telles qu'elles sont et telles qu'elles correspondent aux conditions physiologiques de l'oxygénéation leur position et leur forme est la résultante de nombreux facteurs tels que la p_{CO_2} et la température du sang arté-

Tableau IV¹

| | <i>Raia ocellata</i> | <i>Chelydra serpentina</i> | Canard | Oie | Homme |
|---|----------------------|----------------------------|--------|------|-------|
| O ₂ total transporté, vol. % | 3,92 | 3,70 | 10,0 | 5,14 | 5,30 |
| O ₂ transporté sous forme dissoute, vol. % | 0,22 | 0,17 | 0,15 | 0,17 | 0,10 |

¹ M. FLORKIN, Ann. Physiol. 10, 599 (1934).

Tableau V¹ $\dot{p}_{O_2} = \pm 150$ (dans l'eau en équilibre avec l'air, ou dans l'air)

| | <i>Sipunculus nudus</i> | <i>Urechis caupo</i> | <i>Busycon canalicul.</i> | <i>Loligo pealei</i> | <i>Raia ocellata</i> | <i>Chelydra serpentina</i> | Canard | Oie | Homme | Cheval |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Transporteur . | <i>Hr</i> | <i>Hb</i> | <i>Hcy</i> | <i>Hcy</i> | <i>Hb</i> | <i>Hb</i> | <i>Hb</i> | <i>Hb</i> | <i>Hb</i> | <i>Hb</i> |
| \dot{p}_{O_2} artérielle . | 32 | 75 | 36 | 115 | 70 | 57 | 102 | 94 | 100 | 78 |
| % sat. sg. artériel | 90 | 97 | 95 | 97 | 93 | 95 | 98 | 96 | 98 | 96 |

riel, l'affinité particulière de l'hémoglobine pour l'oxygène, l'intensité de l'effet Bohr, etc. Telles qu'elles sont, elles représentent une composante de l'ensemble du mécanisme respiratoire de l'animal considéré et elles s'intègrent comme telles dans le complexe de ce mécanisme respiratoire particulier à l'organisme, dans son milieu normal.

Le sang de tous les Vertébrés contenant des hématies à hémoglobine, et ces animaux ayant tous un cycle respiratoire bien défini, ils nous serviront utilement de point de départ pour l'étude du rôle de l'hémoglobine dans le transport de l'oxygène par le sang.

Le caractère essentiel de l'intervention de l'hémoglobine dans le transport de l'oxygène chez les Vertébrés est nettement mis en évidence par les valeurs obtenues lors de l'étude du cycle respiratoire, en ce qui concerne l'«oxygène transporté» c'est-à-dire la différence des teneurs en oxygène total du sang artériel et du sang veineux d'une part, et la différence des teneurs des mêmes sanguins en oxygène dissous.

L'intervention, dans le transport de l'oxygène, du caractère sigmoïde de la courbe de dissociation, est évident. Dans les conditions de pressions partielles d'oxygène qui règnent dans le sang artériel et dans le sang veineux, une courbe hyperbolique ne permettrait de transporter qu'une quantité d'oxygène beaucoup plus faible. Lorsque la réduction du sang s'accompagne d'acidification, l'effet Bohr intervient aussi puisque la courbe est déplacée vers la droite, ce qui, à \dot{p}_{O_2} égale entraîne un moindre degré d'oxygénéation de l'hémoglobine.

La courbe de dissociation, telle qu'elle existe dans les conditions artérielles et dans les conditions veineuses présente-t-elle des caractères qui peuvent être mis en parallèle avec des caractères physiologiques ou écologiques de l'animal?

Si nous examinons, quel que soit le transporteur d'oxygène que contient leur sang, les quelques espèces animales dont le cycle respiratoire du sang est connu, et si nous notons les valeurs de la \dot{p}_{O_2} artérielle et du degré de saturation du sang artériel, nous constaterons qu'il existe d'un cas à l'autre, même pour des animaux vivant dans le même milieu, des gradients très divers de pressions d'oxygène, contrairement à ce qui se passe pour le CO₂ qui est toujours, à peu de chose près, dans

le sang artériel, en équilibre avec le milieu (FLORKIN¹). Et cependant, quelle que soit la \dot{p}_{O_2} résultant des caractères de l'appareil circulatoire, le sang artériel présente un degré de saturation de 90 à 98%. En d'autres termes, dans les exemples connus, quelle que soit la différence entre \dot{p}_{O_2} extérieure et \dot{p}_{O_2} artérielle, le point coordonnant, sur la courbe de dissociation, la \dot{p}_{O_2} artérielle avec le degré de dissociation tombe toujours à l'extrémité supérieure de la portion ascendante du graphique de combinaison de l'oxygène avec son transporteur.

La forme et la position de la courbe de dissociation sont donc adaptées à la physiologie respiratoire de l'organisme, puisque la plus légère diminution de \dot{p}_{O_2} entraîne aussitôt un abandon d'oxygène par l'hémoglobine. La fait, mis en évidence dans le tableau V, qu'il n'est pas justifié de considérer, même chez les animaux aquatiques, que la \dot{p}_{O_2} artérielle est égale à la \dot{p}_{O_2} extérieure est encore attesté par les observations de FOX².

En dépit de notre peu de connaissances quant à leur cycle respiratoire, il est possible d'établir, en ce qui concerne les Poissons, une relation entre le caractère plus ou moins vertical de leur courbe de dissociation et la teneur du milieu extérieur en oxygène. Proposée dès 1919 par KROGH et LEITCH³ cette relation a reçu depuis de nombreuses confirmations. Comme ces auteurs l'ont fait remarquer, une forte affinité pour l'oxygène permet à un Poisson vivant dans de l'eau mal oxygénée de charger son sang en oxygène plus facilement que ne le ferait un Poisson possédant une hémoglobine à basse affinité. D'autre part, une forte affinité, encore accentuée par une basse température, maintiendra la courbe dans la région gauche du graphique, c'est-à-dire vers les basses pressions et l'oxygène sera par conséquent livré à faible pression aux tissus, sauf si l'intervention d'un effet Bohr efficace déplace la courbe vers la droite. Plusieurs expérimentateurs⁴ ont confirmé que l'effet Bohr est, chez les Poissons d'eau douce, plus marqué chez ceux qui habitent les eaux

¹ M. FLORKIN, Ann. Physiol. 10, 599 (1934).

² H. M. FOX, J. exp. Biol. 21, 161 (1945).

³ A. KROGH et I. LEITCH, J. Physiol. 52, 288 (1919).

⁴ E. N. WILLMER, J. exp. Biol. 11, 283 (1934). — F. E. J. FRY et E. C. BLACK, Anat. Rec. 72 (suppl.), 47 (1938). — F. E. J. FRY, Am. Assoc. Adv. Sci. publ. no. 10, 132 (1939). — E. C. BLACK, Biol. Bull. 79, 215 (1940). — I. IRVING, E. C. BLACK et V. SAFFORD, Biol. Bull. 80, 1 (1941). — J. K. W. FERGUSON et E. C. BLACK, Biol. Bull. 80, 139 (1941).

profondes et froides et que les sanguins des mêmes poissons présentent aussi une moindre affinité pour l'oxygène, à de faibles p_{CO_2} . Ces deux caractéristiques, faible affinité et effet Bohr relativement fort, contrebloquent les propriétés imposées au sang par la basse température. Différentes observations montrent l'intervention plus ou moins marquée de l'«effet de pompe» exercé par l'effet Bohr, chez les Poissons d'eaux profondes, dans la libération d'oxygène au niveau de la vessie natatoire¹. Mais si l'effet Bohr est plus marqué chez les Téléostéens d'eau douce que chez les Mammifères, il est encore bien plus prononcé chez les Téléostéens marins (Root²) ce qui cadre avec une propriété caractéristique des Téléostéens marins, celle d'avoir une p_{CO_2} artérielle basse, correspondant à celle de l'eau de mer. Ici l'effet Bohr apparaît comme une efficace correction du caractère presque hyperbolique de la courbe de dissociation, sans que cette correction soit, comme elle le serait dans un milieu riche en CO_2 , payée par une diminution des mécanismes de charge. L'effet Bohr des Poissons offre beaucoup d'autres particularités intéressantes. Il présente des caractères différents dans le sang total et dans le sang hémolysé, et il faut ajouter à ce dernier, pour obtenir le même effet, des quantités de CO_2 beaucoup plus élevées, ce qui indique, soit qu'il règne dans les hématies de poissons un p_H notablement plus acide que celui du plasma (Root et Irving³), soit que l'hémolyse produise une modification de constante de dissociation acide, conformément à une hypothèse proposée par ALFRED REDFIELD.

Un autre exemple de relation entre l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine du sang artériel et la teneur en oxygène du milieu est fourni par les Mammifères vivant à de hautes altitudes, tels que le lama (*Lama huana*), le vicuna (*Lama vicugna*) et le viscacha (*Lagostoma* sp.) dont les hémoglobines ont une affinité plus élevée pour l'oxygène que celles des autres Mammifères (HALL, DILL et BARRON⁴).

Le rôle de l'hémoglobine dans le transport de l'oxygène au cours du cycle respiratoire est bien moins connu encore chez les Invertébrés que chez les Vertébrés. Nous n'avons en effet à notre disposition aucune donnée quantitative quant aux caractères du sang artériel ou du sang veineux d'un Invertébré pourvu d'une circulation et d'un sang à hémoglobine. Les conditions de la mise en jeu d'une hémoglobine comme transporteur au cours d'un cycle respiratoire sont les suivantes : il faut que la pression partielle de l'oxygène soit plus basse au niveau des tissus qu'au niveau de l'organe de l'hématose, et il faut que la pression partielle d'oxygène régnant au niveau des tissus soit plus faible que

la pression correspondant à un degré de saturation de 100% dans la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. A une époque où une juste notion de la différence qui peut régner, en ce qui concerne la p_{O_2} , entre le milieu intérieur à l'endroit anatomique de l'hématose, et le milieu extérieur, n'était pas courante, il apparaissait comme peu vraisemblable que la p_{O_2} tissulaire pût s'abaisser à des valeurs aussi faibles que celles qui correspondent aux positions inférieures des courbes de dissociation d'hémoglobines à forte affinité pour l'oxygène, telles qu'on les trouve chez les Invertébrés.

Nous assistons aujourd'hui à un renversement de tendance. Un procédé qui a maintes fois été utilisé pour mettre en évidence le rôle des hémoglobines d'invertébrés est celui qui consiste à éliminer l'intervention du transporteur d'oxygène en le combinant avec l'oxyde de carbone pour lequel l'hémoglobine a une très forte affinité sans toutefois inhiber le fonctionnement des oxydases cellulaires dont l'affinité pour l'oxyde de carbone est plus faible. C'est ainsi que DAUSEND¹ chez *Tubifex* et KRÜGER², puis JOHNSON³ chez *Lumbricus* ont observé que la consommation d'oxygène est moindre chez les animaux traités par l'oxyde de carbone que chez les animaux normaux, et cela même quand la p_{O_2} du milieu extérieur est la pression partielle de l'oxygène dans l'air atmosphérique. Dans son étude sur le lombric, JOHNSON apprécie par le détournement de la mesure des consommations d'oxygène chez les animaux traités par l'oxyde de carbone et chez les animaux non traités, la quantité d'oxygène transportée par le ministère de l'hémoglobine et il conclut que lorsqu'on compare les valeurs obtenues dans différentes conditions de p_{O_2} extérieures décroissantes, on observe une chute rapide débutant entre 38 et 19 mm de p_{O_2} extérieure.

Il en déduit que la p_{O_2} correspondant à la saturation de l'hémoglobine de lombric par l'oxygène doit être supérieure à 19 mm de mercure. C'est là une conclusion qui n'est pas justifiée. On doit dire plus justement qu'elle doit être supérieure à la p_{O_2} qui règne dans le sang artériel quand la p_{O_2} extérieure est de 19 mm, et il s'agit vraisemblablement d'une valeur beaucoup plus basse, ce qui est d'ailleurs plus conforme aux caractères des hémoglobines d'Invertébrés et renforce la notion selon laquelle elles doivent fonctionner comme transporteurs. On sait quelle abondante littérature est consacrée à la fonction de l'hémoglobine du chironome. Des expériences récentes d'EWER⁴ accomplies dans de meilleures conditions techniques que les anciennes montrent que la transformation de l'hémoglobine en carboxyhémoglobine ne diminue pas la consommation d'oxygène de larves de *Chironomus* vivant dans de l'eau saturée d'air (7,5 cm³ O₂ par l) à 17°. Si la teneur

¹ J. S. HALDANE, Respiration, New Haven (1922). — F. G. HALL, Biol. Bull. 47, 79 (1924). — W. JACOBS, Z. vergl. Physiol. 11, 565 (1930). — J. v. LEDEBUR, Z. vergl. Physiol. 25, 156 (1987).

² R. W. ROOT, Biol. Bull. 61, 427 (1931).

³ R. W. ROOT et L. IRVING, Biol. Bull. 84, 207 (1943).

⁴ F. G. HALL, D. B. DILL et E. S. G. BARRON, J. cell. and comp. Physiol. 8, 301 (1936).

¹ K. DAUSEND, Z. vergl. Physiol. 14, 557 (1931).

² F. KRÜGER, Verh. dtsch. zool. Ges., Leipzig 40, 141 (1938).

³ M. L. JOHNSON, J. exp. Biol. 18, 263 (1942).

⁴ R. F. EWER, J. exp. Biol. 18, 197 (1942).

de l'eau en oxygène descend en dessous de 3 cm³ par litre, la consommation d'oxygène des animaux traités par le CO est plus faible que celle des animaux non traités. D'autre part, LEITCH¹ a observé qu'à 17°, si on réduit progressivement la teneur de l'eau en oxygène, le sang se réduit complètement quand la ρ_{O_2} de l'eau correspond à 2,9 mm. On peut donc admettre que l'hémoglobine reste complètement oxygénée quand la ρ_{O_2} extérieure est supérieure à 60 mm de Hg environ, et qu'elle reste complètement réduite aux valeurs de la ρ_{O_2} extérieures moindres que 3 mm environ. Entre ces limites, il est raisonnable d'admettre que l'hémoglobine agit comme transporteur, puisque la larve de *Chironomus* est pourvue d'un système circulatoire bien individualisé (PAUSE²). La difficulté qui persiste est la forte affinité de l'hémoglobine du chironome pour l'oxygène ($\rho_{50} = 0,6$ mm de Hg à 17°) et le fait que cette forte affinité, favorable à la charge, n'est pas corrigée par un déplacement de la courbe vers la droite au niveau des tissus, puisque l'effet Bohr n'existe pas (FOX³). La combinaison faible affinité — fort effet Bohr telle que nous l'avons signalée chez les Poissons comme adaptation aux conditions du milieu apparaît en effet, dans le domaine des sangs à hémoglobine, comme une acquisition des Vertébrés.

Quoi qu'il en soit, l'hémoglobine du chironome est vraisemblablement un transporteur d'oxygène utilisé par la larve lorsqu'elle vit dans des milieux pauvres en oxygène. La validité de cette conclusion ne peut cependant être confirmée que par une étude écologique et physiologique des larves de chironomides pourvues ou dépourvues d'hémoglobine.

Dans une pareille étude on ne doit pas perdre de vue que le rôle d'un transporteur d'oxygène n'est pas uniquement de prendre de l'oxygène au milieu, mais encore de le livrer aux tissus en quantités correspondant au métabolisme, lequel doit être pris en considération dans les études comparatives.

Pendant la période au cours de laquelle la notion de la forte affinité pour l'oxygène des hémoglobines des Invertébrés a détourné les biologistes d'accepter le rôle transporteur de ces hémoglobines, la tendance a été de leur conférer le rôle d'accumulateurs d'une réserve d'oxygène, pouvant être utilisée dans des éventualités plus ou moins nettes d'anaérobiose. La tendance actuelle est vers l'abandon de ce rôle d'accumulateur de réserve (FOX⁴). C'est là une réaction excessive.

La fixation d'une réserve sur l'hémoglobine est un phénomène général qui s'observe aussi chez les Vertébrés. Lorsque le sang veineux quitte les tissus pour reprendre son chemin vers le cœur, la pression partielle de l'oxygène dans le sang est respectivement de 40 mm

de mercure chez l'homme (A.V.B.)¹, de 38 mm chez le cheval¹, de 56 mm chez l'oie², de 37 mm chez le canard², de 15 mm chez la tortue *Chelydra serpentina*¹, de 14 mm chez la raie *Raia ocellata*³, et le degré de saturation correspondant est respectivement de 60% chez l'homme, de 70% chez l'oie, de 38% chez le canard, de 35% chez la tortue *Chelydra* et de 33% chez la raie. D'une part est assuré ainsi au niveau de l'échange avec les tissus un gradient de concentration de pressions d'oxygène qui est un facteur important de la fourniture de cet élément aux cellules. D'autre part, le sang veineux reste chargé d'une réserve d'oxygène à laquelle il est fait appel lors d'une augmentation de métabolisme, ou lorsque l'hématose est en défaut.

Le rôle de cette réserve est bien mis en évidence chez les phoques, qui, au cours de la plongée utilisent presque totalement la charge d'oxygène de leur sang⁴. La réduction presque totale du sang veineux a été signalée chez d'autres animaux plongeurs, comme le canard⁵ et le rat musqué⁴.

Les conditions typiques de l'utilisation, comme réserve, de la charge de l'hémoglobine apparaissent au cours des périodes de suspension des mécanismes respiratoires de la charge d'oxygène. Chez un Invertébré dépourvu de circulation comme *Urechis*, ce rôle de réserve apparaît de manière particulièrement nette. L'échiurien *Urechis caupo* dont la fonction respiratoire du liquide coelomique a été étudiée par REDFIELD et FLORKIN⁶, habite, le long de la côte californienne, des sables vaseux et il vit dans un tube en U dans lequel il fait au cours de ses périodes d'activité, circuler l'eau, par le jeu du péristaltisme de son tube musculo-cutané. L'eau continuellement renouvelée, lui apporte sa nourriture sous la forme de microorganismes qu'il retient dans un entonnoir muqueux fort élégamment construit. Elle lui apporte aussi de l'oxygène. En effet, au fur et à mesure que l'eau circule, et par le jeu d'un péristaltisme de sens inverse de celui de son tube musculo-cutané, l'animal «l'inspire» en quelque sorte à travers l'anus dans son intestin terminal, très développé, et dont la paroi très amincie est en contact avec le liquide chargé d'hématies à hémoglobine qui remplit sa vaste cavité coelomique. A une série de ces mouvements d'inspiration, fait suite un seul mouvement d'expiration au cours duquel l'animal rejette toute l'eau que contient son intestin. Dans de l'eau bien oxygénée, l'hémoglobine du liquide coelomique est presque complètement saturée (97%) bien que la pression partielle d'oxygène y soit de 75 mm de mercure seulement, c'est-à-dire

¹ L. J. HENDERSON, Blood. A study in general Physiology (Yale Univ. Press, New Haven, 1928).

² H. WASTL et G. LEINER, Pflügers Arch. 227, 421 (1931).

³ D. B. DILL, H. T. EDWARDS et M. FLORKIN, Biol. Bull. 62, 23 (1932).

⁴ L. IRVING, O. M. SOLANDT, D. Y. SOLANDT et K. C. FISHER, J. cell. and comp. Physiol. 6, 393 (1935).

⁵ P. LANGLOIS et C. RICHEY, C. R. Soc. Biol. 20, 483 (1898).

⁶ A. C. REDFIELD et M. FLORKIN, Biol. Bull. 61, 185 (1931).

¹ J. LEITCH, J. Physiol. 50, 370 (1916).

² J. PAUSE, Zool. Jb., Abt. allg. Zool. und Physiol. 36, 339 (1918).

³ H. M. FOX, J. exp. Biol. 27, 161 (1945).

⁴ H. M. FOX, Nature 145, 781 (1940).

notablement moindre que dans l'eau ambiante (environ 150 mm). Si l'animal reste dans ces conditions, son hémoglobine reste presque complètement saturée et l'oxygène dissous suffit aux besoins de l'animal. Ce dernier, comme nous l'avons dit, aspire dans son intestin terminal de l'eau de mer et la rejette après avoir oxygéné à ses dépens son liquide cœlomique. (Dans l'eau d'expiration $\rho_{O_2} = 100$ mm environ.) Dans ces conditions il n'utilise pas son hémoglobine. Le volume du liquide cœlomique étant, pour l'individu que nous considérons, de 20 cm³, et son pouvoir oxyphorique étant de 4 volumes pour cent, son liquide cœlomique contient en tout 0,8 cm³ d'oxygène. La consommation d'oxygène d'un *Urechis* moyen étant d'environ 0,01 cm³ par minute, on voit qu'une faible portion de l'oxygène doit être remplacée pendant chaque minute, et l'oxygène qui est apporté sous forme dissoute y suffit¹. Dans les conditions de ses périodes d'activité, coïncidant avec ses périodes d'alimentation, *Urechis* vit donc aux dépens de l'oxygène qui lui est fourni, sous forme d'oxygène dissous, par son appareil respiratoire particulier. Mais quand l'animal se retire dans la portion médiane de la région horizontale de son tube après une période d'activité, il y reste immobile, et cesse de faire circuler l'eau et de l'aspirer dans son tube digestif.

L'oxygène total contenu dans son liquide cœlomique et dans l'eau de son intestin correspond à la quantité qu'il consomme pendant 70 minutes, alors que si le liquide cœlomique ne contenait pas d'hémoglobine, l'oxygène serait consommé en 14 minutes. La présence de l'hémoglobine permet donc à l'animal une période de repos multipliée par 5, entre ses périodes d'activité.

Quand l'*Urechis* respire, il assure à l'eau de son intestin terminal une ρ_{O_2} de 100 mm, quand la ρ_{O_2} de l'eau est de 150 mm.

Dans ces conditions la ρ_{O_2} du liquide cœlomique est de 75 mm. Ces conditions correspondent à un degré de saturation de 97%. L'hémoglobine des hématies reste saturée et l'oxygène diffuse de l'eau intestinale vers le plasma sanguin et de là vers les tissus sans qu'on puisse mettre en évidence de rôle transporteur de l'hémoglobine, laquelle ne circule pas. Au cours de ses périodes de repos, l'animal cesse de respirer. Il ne renouvelle donc plus l'oxygène de son eau intestinale et par conséquent la ρ_{O_2} de son plasma cœlomique va diminuer, ce qui entraînera aussitôt, une libération d'oxygène par l'hémoglobine.

Il est vraisemblable que l'hémoglobine de *Planorbis* joue aussi un rôle de réservoir d'hémoglobine, puisque la planorbe vient respirer à la surface de l'eau périodiquement et que dans l'intervalle de ces épisodes inspiratoires la ρ_{O_2} de son sang doit baisser progressivement. C'est là un phénomène analogue à celui qui se produit au cours de la plongée d'un phoque. L'arénicole vit dans un tube dont l'extrémité, correspondant à l'ex-

trémité postérieure du ver, s'ouvre à la surface du sable et il présente une ventilation rythmique de sa galerie dans laquelle il fait pénétrer l'eau au cours de périodes de ventilation qui durent 10 à 15 minutes et qui sont séparées par des périodes de repos qui peuvent durer jusqu'à 50 minutes¹. Au cours des périodes de repos, il est vraisemblable que la ρ_{O_2} veineuse diminue plus qu'au cours des périodes d'activité et que, par conséquent, la réserve d'oxygène telle qu'elle a été définie plus haut, se trouve entamée.

En fait, le rôle de porteur de réserve, traduit par le maintien dans le sang veineux d'un certain degré de saturation qui est entamé au cours des circonstances qui amènent un abaissement plus marqué que normalement de la ρ_{O_2} au niveau du sang veineux, est une fonction générale de l'hémoglobine.

Si le rôle de réserve apparaît plus nettement chez *Urechis*, c'est parce qu'il n'a pas de cycle respiratoire et parce que la fonction de transporteur est réduite chez lui à des proportions qu'il est difficile de préciser.

L'hémoglobine ne transporte pas seulement l'oxygène mais elle agit soit directement, soit indirectement, dans le phénomène de transport de l'anhydride carbonique.

En 1928, HENRIQUES² a apporté des arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'acide carbonique peut se combiner avec l'hémoglobine pour former des combinaisons du type de l'acide carbamique



FERGUSON et ROUGHTON³ ont démontré expérimentalement le bien-fondé de cette hypothèse et FERGUSON⁴ a montré que 8 à 10% du CO₂ total sont transportés selon ce mode chez le bœuf et 10–16% chez l'homme. Malheureusement l'étude comparative de ce phénomène doit encore être réalisée. FERGUSON, HORVATH et PAPPENHEIMER⁵ ont vainement tenté de le mettre en évidence chez la roussette *Mustelus canis*. Dans l'étude du sang de *Crocodilus acutus* publiée par DILL et EDWARDS⁶ en 1931, c'est-à-dire avant les travaux de ROUGHTON, on trouve l'indication de l'apparition dans les globules, lors de la réduction, d'une quantité de CO₂ combiné plus élevée que celle qui serait conforme aux relations d'équilibre définies par VAN SLYKE, WU et MCLEAN⁷. Il y a peut-être là une indication de combinaison sous forme de carbamate.

La forme la plus générale et la plus primitive de l'intervention de l'hémoglobine dans le transport du CO₂ résulte des variations de sa dissociation avec la réac-

¹ L. VAN DAM, Zool. Anz. 118, 122 (1937).

² O. M. HENRIQUES, Biochem. Z. 200, 1, 5, 10, 18, 22 (1928).

³ J. K. W. FERGUSON et F. J. W. ROUGHTON, J. Physiol. 83, 68 (1934).

⁴ J. K. W. FERGUSON, J. Physiol. 88, 40 (1937).

⁵ J. K. W. FERGUSON, S. M. HORVATH et J. R. PAPPENHEIMER, Biol. Bull. 75, 381 (1938).

⁶ D. B. DILL et H. T. EDWARDS, J. biol. Chem. 90, 515 (1931).

⁷ D. D. VAN SLYKE, H. WU et F. C. MCLEAN, J. biol. Chem. 56, 765 (1923).

tion. Quand le ρ_H diminue et se rapproche du point isoélectrique de l'hémoglobine, cette dernière abandonne de la base qui devient utilisable pour une combinaison avec l'acide carbonique.

L'hémoglobine se place ainsi parmi les substances contenues dans le sang et dont la dissociation varie avec la réaction, substances dont l'intervention explique la classique «courbe de dissociation de l'acide carbonique». L'hémoglobine dont la capacité de combinaison pour les bases est notablement plus élevée que celle des protéines du plasma est un facteur prépondérant de la position des courbes de dissociation des sangs qui la contiennent.

Il existe encore un autre mode d'intervention de l'hémoglobine dans le transport du CO₂. C'est le fait que, chez les animaux supérieurs tout au moins, sa dissociation varie avec l'oxygénéation. L'oxygénéation de l'hémoglobine déplace son point isoélectrique: chez le cheval, par exemple, alors que le point isoélectrique de l'hémoglobine réduite correspond au ρ_H 6,78, celui de l'oxyhémoglobine correspond au ρ_H 6,65¹. Au ρ_H isoélectrique, l'hémoglobine fixe des quantités équivalentes, assez faibles, d'acides et de bases, mais le ρ_H régnant dans les hématies étant alcalin par rapport au point isoélectrique, l'hémoglobine s'y trouve à l'état de sel, en combinaison avec des bases.

Au ρ_H du sang, l'hémoglobine se comporte comme un acide polyvalent disposant d'au moins cinq groupements acides par atome de fer.

L'oxyhémoglobine du cheval dont le point isoélectrique est au ρ_H 6,65, contient, entre autres, une fonction acide (ou un groupe de fonctions) faiblement dissociée dont le $\rho_K = 6,16$. Cette fonction, dans les hématies du sang oxygéné de cheval dont le ρ_H est égal à 7,1, est en grande partie saturée par des bases. L'hémoglobine présente un caractère moins acide, puisque son point isoélectrique est au ρ_H 6,8. Cette modification du point isoélectrique par la variation d'oxygénéation est due à une forte diminution de la dissociation des groupements acides voisins du groupement oxygénable, et dont nous avons parlé ci-dessus. Leur ρ_K passe de 6,16 à 7,80. Lorsqu'une telle transformation se produit dans un milieu dont le ρ_H ne varie pratiquement pas, elle comporte la libération des bases fixées à cette fonction. Le fait que la réduction du sang relève sa courbe d'absorption du CO₂, connu sous le nom d'*«effet Haldane»* apparaît comme un caractère d'évolution de l'hémoglobine. On ne le décèle pas, en effet, au niveau du sang de la raie², de la roussette *Mustelus canis*³ ou d'*Urechis*⁴ qui contiennent des hémoglobines dont la dissociation ne varie pas avec l'oxygénéation.

Ce que nous avons dit des hématinoprotéides oxygénables dérivées du protohème et appelées hémoglobines aura sans doute convaincu le lecteur de ce que ces substances ne constituent pas partout des entités chimiques identiques comme c'est le cas à travers le règne animal pour les molécules d'urée ou d'acide urique. Il existe une série de variétés d'hémoglobines et cette notion a même conduit à différentes reprises à attribuer une dénomination particulière aux hémoglobines des Invertébrés auxquelles VLÈS¹ donne le nom de *protohémoglobines* et SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL², reprenant une suggestion de RAY LANKESTER, celui d'*érythrocroraines*. On doit espérer que la suggestion de KEILIN et WANG³ qui estiment préférable d'abandonner ces dénominations et conserver le terme générique d'hémoglobines pour désigner l'ensemble des hématinoprotéides oxygénables dérivées du protohème, sera généralement acceptée, car il n'y a aucune raison de réservier l'ancienne dénomination générale à une hémoglobine particulière, celle des Vertébrés, pour attribuer une dénomination particulière nouvelle à un ensemble complexe d'autres hématinoprotéides oxygénables dérivées du protohème.

Les différences qui séparent les diverses hémoglobines et qui caractérisent les degrés plus ou moins marqués de leur homologie biochimique sont vraisemblablement dues aux caractères de la portion protéïnique de leurs molécules.

L'homologie est d'un ordre différent entre hémoglobines et chlorocruorines qu'entre les diverses variétés d'hémoglobines lesquelles sont toutes des dérivés du protohème. Les chlorocruorines contiennent en effet un hème différent, le chlorocruorohème, dérivé de la chlorocruoroporphyrine, qui est l'acide 1,3,5,8-tétraméthyl-2-formyl-4-vinylporphyrine-6,7-dipropanoïque.

L'hème des chlorocruorines se distingue donc de celui des hémoglobines (qui est un dérivé de la protoporphyrine ou acide 1, 2, 3; 5, 8-tétraméthyl-2, 4-divinylporphrine-6, 7-dipropanoïque) par une différence minime, l'oxydation du groupement vinyle 2. On trouve de la chlorocruorine, à l'état dissous, dans le plasma sanguin des membres d'un petit nombre de groupes bien délimités d'Annélides polychètes, les Chloréniens, les Sabelliens et les Serpuliens. Le pigment a reçu son nom de RAY LANKESTER⁴ en 1867. Oxygéné, il est vert en solution diluée et rougeâtre en solution concentrée. Le pigment réduit est, en solution diluée, de couleur jaunâtre.

La chlorocruorine a été le sujet d'une série d'importantes études de FOX⁵. Comme c'est le cas pour les

¹ D. D. VAN SLYKE, A. B. HASTINGS, M. HEIDELBERGER et J. M. NEILL, J. biol. Chem. 54, 81 (1922).

² D. B. DILL, H. T. EDWARDS et M. FLORKIN, Biol. Bull. 62, 23 (1932).

³ J. K. W. FERGUSON, S. M. HORVATH et J. R. PAPPENHEIMER, Biol. Bull. 75, 381 (1938).

⁴ A. C. REDFIELD et M. FLORKIN, Biol. Bull. 61, 185 (1931).

¹ F. VLÈS, Arch. Phys. Biol. 2, no 6, 1 (1923).

² T. SVEDBERG et I. B. ERIKSSON-QUENSEL, J. Am. chem. Soc. 55, 2834 (1933).

³ D. KEILIN et Y. L. WANG, Biochem. J. 40, 855 (1946).

⁴ E. R. LANKESTER, J. Anat. and Physiol. 2, 114 (1867).

⁵ H. M. FOX, Proc. Cambr. Phil. Soc. 1, 204 (1924); Arch. Phys. Biol. 5, 85 (1926); Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 99, 199 (1926); 111, 356 (1932); 115, 368 (1934).

Tableau VI

| | Point isoélectrique | Poids moléculaire ⁵ 17000 (\pm) | Teneur en acides aminés ⁶ | | | |
|---------------------------------------|---------------------|---|--------------------------------------|------------|-------------|----------|
| | | | Cystine % | Arginine % | Histidine % | Lysine % |
| Hémoglobine de cheval . . . | 6,78 ¹ | 4 | 0,74 | 3,57 | 8,13 | 8,31 |
| Hémoglobine de lombric . . . | 5,28 ² | 192 | 1,41 | 10,07 | 4,68 | 1,73 |
| Hémoglobine d'arénicole . . . | 4,76 ³ | 192 | 4,08 | 10,04 | 4,03 | 1,85 |
| Chlorocruorine de <i>Spirographis</i> | 4,3 ⁴ | 192 | 1,64 | 9,64 | 2,38 | 3,64 |

hémoglobines, la combinaison de l'oxygène à la chlorocruorine se fait jusqu'à concurrence de la fixation d'une molécule d'oxygène par atome de fer⁷. Il existe entre les chlorocruorines provenant de diverses espèces, notamment sous le rapport du spectre d'absorption, des différences légères analogues à celles qui distinguent les hémoglobines. Les différentes chlorocruorines contiennent le même hème, ce que démontre le fait que les chlorocruorohémochromogènes (combinaisons du chlorocruorohème et d'une substance azotée) d'une même substance azotée, préparés à partir de différentes chlorocruorines, sont identiques⁸. Si, à de la globine de bœuf, on combine un chlorocruorohème, on obtient une chlorocruorine, comme l'indiquent les caractères du spectre d'absorption⁹. La nature du constituant protéique influence la position des bandes du spectre visible, qui n'est pas identique pour les différentes chlorocruorines provenant de l'union d'un chlorocruorohème d'origine déterminée avec différentes globines¹⁰.

On doit donc admettre que le type de spectre d'absorption caractéristique des chlorocruorines est dû à la présence d'un hème commun, et les différences spécifiques à la présence de constituants protéiniques légèrement différents.

Le spectre d'absorption de l'oxychlorocruorine est, comme celui de l'hémoglobine, un spectre de dérivé d'hème.

On trouve dans le visible deux bandes α et β , correspondant aux bandes de même nom dans le spectre de l'oxyhémoglobine. On trouve en outre une bande peu prononcée (β') qui n'a pas d'analogie dans le cas de l'oxyhémoglobine. Dans l'ultra-violet, on observe l'existence de trois bandes, correspondant aux bandes γ , γ' et φ de l'hémoglobine¹¹. On trouvera dans le tableau

VI une série de caractéristiques de la chlorocruorine de *Spirographis* comparées aux caractéristiques correspondantes des hémoglobines du cheval, du lombric et de l'arénicole. Ce tableau montre nettement que s'il existe des propriétés qui justifient la distinction entre hémoglobines et chlorocruorines, il en existe d'autres qui rapprochent les hématinoprotéides oxygénables des Annélides, que ces hématinoprotéides soient du type hémoglobine ou du type chlorocruorine. En somme la chlorocruorine apparaît comme une mutation chimique de l'hémoglobine des Annélides, ayant conservé différents caractères typiques de cette hémoglobine.

Il n'est pas possible de passer sous silence, dans un exposé de la biologie des hématinoprotéides oxygénables, la question de leur métabolisme, quelle que soit la pauvreté du chapitre de la biochimie comparée qui leur est consacré.

Si obscur que puisse rester l'anabolisme de l'hémoglobine chez les Vertébrés adultes, le lieu de sa synthèse est bien défini et localisé dans la moelle osseuse, tandis que chez les Invertébrés, aucune indication n'existe quant au mécanisme de la synthèse de l'hémoglobine ou de la chlorocruorine, pas plus qu'au lieu de cette synthèse.

Quant au catabolisme de l'hémoglobine chez les Vertébrés, on s'accorde aujourd'hui pour admettre que les étapes de son déroulement vers la formation de pigments biliaires sont, entre autres, la perte du fer et la formation de pseudohémoglobine, par ouverture du cycle tétrapyrrolique¹. Chez les Invertébrés, on a tendance à admettre que le processus s'accomplirait par le stade intermédiaire de l'hématine, c'est-à-dire non par perte de fer dans la première étape, mais par perte de globine, le fer étant ensuite séparé du noyau tétrapyrrolique qui serait excréte sous forme de porphyrine. Les arguments en faveur de cette théorie sont: le fait qu'on ne peut mettre en évidence de pigments biliaires dans l'organisme des Invertébrés, le fait qu'on a parfois mis en évidence, dans des cellules d'Invertébrés, des grains d'hématine (c'est de cette nature que sont, d'après BAUMBERGER et MICHAELIS², les gra-

¹ D. D. VAN SLYKE, A. B. HASTINGS, M. HEIDELBERGER et J. M. NEILL, J. biol. Chem. 54, 81 (1922).

² T. SVEDBERG, J. biol. Chem. 103, 311 (1933).

³ K. O. PEDERSEN, Koll. Z. 63, 268 (1933).

⁴ J. ROCHE, C. R. Soc. Biol. 114, 1190 (1933).

⁵ T. SVEDBERG, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 127, 1 (1939).

⁶ J. ROCHE et G. JEAN, Bull. Soc. Chim. biol. 16, 769 (1934). —

J. ROCHE et M. MOURQUE, Bull. Soc. Chim. biol. 23, 1329 (1941).

⁷ H. M. FOX, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 115, 368 (1934).

⁸ H. M. FOX, Arch. Phys. Biol. 5, 85 (1926); Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 99, 199 (1926).

⁹ O. WARBURG et E. NEGELEIN, Biochem. Z. 244, 9 (1932). —

J. ROCHE, C. R. Soc. Biol. 114, 1190 (1933).

¹⁰ J. ROCHE, C. R. Soc. Biol. 114, 1190 (1933).

¹¹ J. ROCHE et H. M. FOX, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 114, 161 (1934).

¹ C. LIEBECQ, Conception actuelle du Catabolisme de l'hémoglobine (Masson, Paris et Liège, Desclé, 1946); Exper. 4, fasc. 4, 56 (1948).

² J. P. BAUMBERGER et L. MICHAELIS, Biol. Bull. 61, 417 (1931).

nulations décrites par REDFIELD et FLORKIN¹, dans les hématies d'*Urechis*) et le fait qu'on a parfois mis en évidence des porphyrines dans des tissus considérés, à tort ou à raison, comme des organes de la dégradation de l'hémoglobine².

Si on n'a pas de renseignements précis au sujet du catabolisme de l'hémoglobine ou de la chlorocruorine appartenant en propre à l'organisme d'un Invertébré, on a grâce à un très beau travail de WIGGLESWORTH³ de très intéressants renseignements quant au catabolisme de l'hémoglobine introduite dans le sang, soit directement par voie expérimentale, soit au cours de la digestion, chez un insecte suceur de sang, l'hémiptère *Rhodnius prolixus*. Le fait que WIGGLESWORTH a pu mettre en évidence, chez cet Insecte, de la bili-verdine dans les cellules péricardiques et un pigment de la nature de la cholglobine dans les cellules épithéliales de l'estomac et de l'intestin doit pousser à reconsiderer de près le catabolisme de l'hémoglobine des Invertébrés. Le passage du catabolisme des hématinoprotéides par un stade correspondant à l'ouverture du cycle tétrapyrrolique alors que ce cycle est en combinaison avec la protéine apparaît d'ailleurs comme un phénomène biologique assez général pour qu'on le retrouve chez des microorganismes tels que le pneumocoque, le streptocoque hémolytique, le streptocoque *viridans*, etc. cultivés dans des milieux au sang⁴, chez la levure de boulangerie⁵ et dans les nodules des racines de Légumineuses⁶.

On reproche parfois à de mauvais peintres trop minu-

tieux, de montrer si bien les feuilles qu'on ne voit plus la forêt. Cet exposé encourra sans doute le reproche inverse, pour avoir dans ce panorama de la biologie des hématinoprotéides oxygénables brossé la forêt à si larges traits qu'on n'y voit plus ni feuilles ni arbres.

Puisse-t-il cependant, en dépit de ses lacunes et de ses imperfections, avoir montré que le biologiste n'est ni téméraire ni inconsidéré lorsqu'il ambitionne de pousser jusqu'à l'échelle moléculaire des phénomènes de l'étude de concepts biologiques aussi fondamentaux que ceux d'adaptation et d'évolution.

Summary

The author reviews a series of biological aspects of the study of oxygenable hematinoproteins, particularly with respect to evolution and adaptation. After a statement of some fundamental concepts of comparative biochemistry and of possible evolutionary relations between oxidation catalysts and oxygen carriers, the natural distribution of hemoglobins is reviewed and their specific characters are enumerated.

A review is made of the data relating to the shape of the oxygen-dissociation curves and to the affinity of haemoglobin for oxygen. It appears, generally speaking, that hyperbolic or almost hyperbolic curves and high affinity for oxygen are characteristic of primitive or embryonic haemoglobins.

A study of the function of haemoglobin in the respiratory cycle of several animal species shows the vital importance of the oxygen carrier as well as the adaptation of the shape and position of the dissociation curve to the character of the respiratory function in the animal considered.

The function of haemoglobin in invertebrates, as oxygen carrier as well as providing a store of oxygen, is emphasized by a review of experimental data.

The function of oxygen in the transport of carbon dioxide is reviewed from the standpoint of comparative biochemistry, and the lack of our knowledge is deplored.

The characteristics of chlorocruorin show it to be a chemical mutation of an Annelid haemoglobin.

Our lack of knowledge in the field of the comparative biochemistry of haemoglobin and chlorocruorin metabolism is pointed out.

¹ A. C. REDFIELD et M. FLORKIN, Biol. Bull. 61, 185 (1931).

² C. RAPHAEL, Etude de la trompe des Glycères et de son organe excréteur d'hémoglobine (Thèse, Paris 1933).

³ V. B. WIGGLESWORTH, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 131, 313 (1948).

⁴ A. B. ANDERSON et H. P. D'ARCY, J. Path. Bacter. 39, 465 (1934).

⁵ R. LEMBERG et R. A. WYNDHAM, J. Proc. Roy. Soc., New South Wales 70, 343 (1937).

⁶ A. I. VIRTANEN, T. LAINE et H. LINKOLA, Suomen Kemistilehti B, 18, 36 (1945).