Zeitschrift: Mémoires de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles. Physiologie, hygiène, bactériologie = Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Freiburg. Physiologie, Hygiene, Bakteriologie

Herausgeber: Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles

Band: 1 (1908-1923)

Heft: 4: Contribution à l'étude des hémocyanines

Artikel: Contribution à l'étude des hémocyanines

Autor: Burdel, Albert

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-306688

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 18.11.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

V. I. F. 4. **Physiologe. Hygiène. Bactériologie.** B. I. H. 4.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE

DES HÉMOCYANINES

PAR LE

Dr ALBERT BURDEL

FRIBOURG
IMPRIMERIE FRAGNIÈRE FRÈRES

1922

INTRODUCTION

Il y a environ un siècle, ERMANN observa que le sang d'Escargot, quand il est aéré (oxygéné), possède une coloration bleue. On a constaté depuis que le sang d'un grand nombre de Mollusques et d'Arthropodes (Crustacés et Arachnides) contient la même espèce de pigment, pigment qui fut dénommé *oxyhémocyanine* par L. FREDERICQ en 1878.

Quand on soumet l'oxyhémocyanine à l'action d'agents réducteurs, même très faibles, elle se décolore et se transforme en hémocyanine. L'oxyhémocyanine, étant une combinaison oxygénée qui se dissocie aisément, constitue, comme on l'a reconnu, un véritable *pigment respiratoire*.

Un autre caractère très important de cette matière colorante, c'est qu'un métal lourd entre dans la constitution de sa molécule: l'hémocyanine est une *substance cuprifère*.

Enfin un dernier caractère doit être encore mentionné, c'est que l'hémocyanine est une protéine complexe (protéide).

En tant que *pigment respiratoire métallifère* et, partiellement, *protéique*, l'oxyhémocyanine (des Invertébrés) doit être rapprochée, comme on l'a fait depuis longtemps, de l'oxyhémoglobine (des Vertébrés et des Invertébrés). Or, on sait que les hémoglobines qu'on extrait des sangs provenant d'espèces différentes ne sont pas identiques. Quelques auteurs (CUÉNOT, REICHERT et BROWN, ALSBERG et CLARK) se sont déjà demandé si l'on ne devait pas également admettre la pluralité des hémocyanines. Nos recherches nous permettent, croyons-nous, de répondre à cette question d'une façon décisive ; elles semblent prouver la

diversité, la spécificité des hémocyanines suivant leur provenance zoologique, et c'est en ce sens justement que nous distinguons plusieurs hémocyanines.

L'étude des oxyhémocyanines est entrée dans une phase nouvelle depuis qu'on est parvenu à en préparer quelques-unes à l'état cristallisé. On verra que la question de la cristallisation des oxyhémocyanines tient une place importante dans notre travail.

Notre thèse comprend trois chapitres: Dans le *premier chapitre*, nous examinons la question de la présence du cuivre dans les sangs hémocyaniques et dans les hémocyanines elles-mêmes.

Dans le *second chapitre*, nous nous occupons de la cristallisation des hémocyanines.

Dans le *troisième chapitre*, nous étudions le spectre d'absorption des hémocyanines.

* *
*

La fin de nos recherches ayant coïncidé avec le début de la guerre, la publication de notre travail s'est trouvée considérablement différée et n'est faite actuellement que d'une façon très abrégée. Le lecteur qui désirerait un exposé plus étendu, plus complet, n'aura qu'à consulter la série de Mémoires sur le sujet publiés par Ch. Dhéré (voir la *Bibliographie* à la fin de notre thèse). Ces Mémoires contiennent notamment les indications historiques et critiques que nous avons cru pouvoir omettre. Seul n'y est pas cité un travail tout récent de G. Quagliariello, privat-docent à l'Université de Naples [1] ; or, cet auteur a précisément repris l'examen de plusieurs questions ayant fait l'objet de nos recherches et de nos publications antérieures. Les résultats qu'il a obtenus confirment les nôtres ; nous les mentionnerons à propos de chacune des questions auxquelles ils se rapportent.

---

[1] Ricerche chimiche e chimico-fisiche sulla emocianina. (Nota III). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 1922.

CHAPITRE PREMIER

Sur la présence du cuivre dans les sangs hémocyaniques et dans les hémocyanines elles-mêmes.

§ 1. Réaction de la formaldoxime.

Il est très facile de constater la présence de cuivre dans les sangs contenant de l'hémocyanine: il suffit d'y introduire un peu de formaldoxime (Réactif de Bach) et d'ajouter un petit excès de soude ; on observe alors, au bout d'une à deux minutes, une coloration intense d'un violet sombre [1]. C'est là une des réactions les plus sensibles des sels de cuivre. Pour obtenir les meilleurs résultats, il convient de prendre certaines précautions que nous avons cherché à préciser dans une petite étude spéciale insérée en *appendice*.

Faisons bien remarquer que, dans le cas d'un échantillon de sang, pour que la réaction soit significative au point de vue de la présence d'hémocyanine, il ne suffit pas de constater l'apparition d'une couleur violette, en opérant comme il vient d'être dit. En effet, le sang peut contenir du cuivre sans contenir pour cela de l'hémocyanine.

Mais nous avons constaté en utilisant de l'hémocyanine pure (hém. d'Escargot crist.), qu'en alcalinisant même fortement avec du carbonate de soude la réaction est négative, tandis qu'elle est positive dès que l'on introduit une trace d'un sel soluble de cuivre. En substituant le carbonate de soude à la soude on peut donc reconnaître s'il existe du cuivre qui n'est pas combiné à l'état d'hémo-

---

[1] Nos essais ont porté sur les sangs de *Helix pomatia, Helix nemoralis, Limnea stagnalis, Murex brandaris, Arion rufus, Eledone moschata, Sepia officinalis, Palinurus vulgaris, Astacus fluviatilis, Maja squinado, Squilla mantis.*

TABLEAU I. — Teneur en cuivre

	ESPÈCES ÉTUDIÉES	CU EN MILLIGR. DANS 100 cc. de sang	CU EN MILLIGR. DANS 100 gr. de sang	AUTEURS	
MOLLUSQUES	*Octopus vulgaris*	18,0		DHÉRÉ (1900)	Sang complet re
		20,0		— —	
		23,5		— —	
		23,0		— (1903)	
		28,5		— —	
		27,0		— (1908)	Sang fluoré (avec
		34,2		HENZE (1901)	Teneur calculée
	Sepia officinalis	**23,7**		DHÉRÉ et BURDEL	Sang fluoré et f
			16,1	HARLESS (1847)	Teneur calculée
			24,4	DUBOIS (1900)	Sang d'escargots
	Helix pomatia	7,0		DHÉRÉ (1900)	
		7,5		— —	—
		8,0		— —	
		6,5		— —	Sang filtré. Esca
		6,0		BURDEL	— —
CRUSTACÉS	*Astacus fluviatilis*		*9,3*	WITTING (1858)	Teneur calculée
			28,0	DOHRN 1861)	—
		4,0		DHÉRÉ (1900)	Sang complet.
		8,0		— —	Sang fluoré et f
		9,0		BURDEL	Sang défibriné e
	Palinurus vulgaris		*22,9*	DUBOIS (1900)	
		7,5		DHÉRÉ (1900)	
		10,5		— —	Sang complet.
		11.0		— —	
		9,0		BURDEL	Sang défibriné e
	Homarus vulgaris	9,5		DHÉRÉ (1900)	—
		10,5		— —	
	Cancer pagurus	3,5		— —	Animaux achetés
		7,5		— —	
		13,5		— —	
		5,5		— (1903)	Sang recueilli à
		7,0		— —	
	Carcinus moenas	8,5		— —	—
		10,0		— —	
	Maja squinado	3,0		— —	Sang filtré; recu
		4,5		— —	
		2,8		BURDEL	Sang filtré; recu
		3,5		—	
		3,6		—	
	Squilla mantis	**6,1**		DHÉRÉ et BURDEL	Sang défibriné e
ARACNHIDES	*Limulus cyclops*		*2,2*	GENTH (1852)	Teneur calculée
	Limulus polyphemus		*4,6*	ALSBERG (1914)	Teneur de 100
			4,9	— —	Sérum. Valeurs
			8,3	— —	

cuivre des sangs hémocyaniques.

OBSERVATIONS

nplet recueilli sur des animaux vivants, à Paimpol (Bretagne).

ré (avec NaF) et filtré. Recueilli à Paimpol et adressé par M. le professeur LAPICQUE.
alculée par nous.
ré et filtré. Echantillon adressé de Trieste par M. le professeur CORI.
alculée par nous.
scargots en hibernation.

— — (décembre).

é. Escargots en hibernation (décembre).
— — (octobre).

alculée par nous.
— —

nplet.
ré et filtré.
ibriné et filtré.

nplet.

ibriné et filtré.

—

achetés aux Halles (Paris). Sang défibriné et filtré.

ueilli à Paimpol ; défibriné et filtré.

— — —

ré ; recueilli à Paimpol.

é ; recueilli sur des animaux vivants expédiés de Trieste.

ibriné et filtré provenant d'animaux vivants expédiés de Trieste.

alculée par nous.
e 100 gr. de sang complet. } Teneurs calculées par nous d'après les données
aleurs extrêmes. } d'ALSBERG et CLARK (1910) et d'ALSBERG (1914).

cyanine. Comme la réaction est positive, dans le cas de l'hémocyanine pure, en alcalinisant par la soude, il faut admettre que la soude caustique détache du cuivre contenu dans la molécule d'hémocyanine.

Ajoutons que nous avons reconnu que pour effectuer cette recherche, d'une façon irréprochable, il convient d'opérer toujours avec une solution de formaldoxime qui préalablement a été *exactement neutralisée* au moyen de soude. En effet, ce réactif préparé selon la formule de Bach est très acide, et cette acidité a deux inconvénients :

1° elle peut décomposer l'hémocyanine avant l'introduction du carbonate de soude ;

2° elle peut transformer l'hémocyanine (et les autres protéines éventuellement) en dérivé acide qui forme un précipité très gênant quand on alcalinise [1].

§ 2. Réaction du biuret sans introduction de cuivre.

On sait que, si l'on ajoute à une solution de substance protéique (albuminoïde, par exemple) un excès de lessive de soude concentrée, et un peu d'une solution très diluée de sulfate de cuivre, on obtient une couleur violacée : c'est la réaction dite du biuret.

L'oxyhémocyanine étant une substance protéique contenant du cuivre, Henze [2] s'est demandé si par simple addition de soude on n'obtiendrait pas la réaction du biuret ; et il a constaté qu'il en était bien ainsi avec l'hémocyanine de Poulpe (la seule qu'il ait étudiée).

---

[1] J. Gautrelet (1903) a décelé le cuivre au moyen de la réaction de la formaldoxime dans les hémolymphes d'*Ostrea edulis, Pecten, Mytilus, Patella.* Comme il s'agissait dans tous les cas de réactions brutes, les observations de cet auteur ne suffisent pas à démontrer la présence d'hémocyanine dans le sang des espèces prénommées. Gautrelet a d'ailleurs constaté aussi une réaction positive des plus intenses avec l'hémocyanine de Poulpe ou de Seiche.

[2] *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, XXXIII, 1901.

Dans nos recherches personnelles, nous avons fait presque toujours une double réaction, en opérant d'une part directement sur le sang et d'autre part, sur une solution d'oxyhémocyanine du même sang de coloration à peu près aussi intense, et nous avons constaté que les deux liqueurs donnaient avec la même quantité de lessive de soude, sensiblement la même réaction. Nous avons remarqué, en outre, que toutes les oxyhémocyanines sur lesquelles ont porté nos expériences, ne donnaient pas la même coloration ; et nous avons par contre observé que celle-ci était assez semblable pour des hémocyanines d'animaux appartenant au même groupe zoologique. Nous distinguerons donc trois cas:

a) Mollusques gastéropodes (Escargot et Rocher). — En ajoutant séparément à 1 cc. de sang de chacun de ces deux Mollusques, deux gouttes de lessive de soude à 15%, nous avons toujours observé qu'il y avait d'abord décoloration complète, puis les sangs devenaient visqueux et se prenaient bientôt en gelée moulée. En même temps ils prenaient une coloration *jaune orange* et durable.

Les solutions d'oxyhémocyanine d'Escargot, traitées de la même façon, nous ont toujours donné un résultat analogue. Comme on le voit, on ne saurait dire qu'il s'agit ici de la réaction du biuret.

b) Mollusques céphalopodes (Élédone et Seiche). — L'oxyhémocyanine des Céphalopodes donne très bien, par simple addition de soude caustique, la réaction du biuret. Nous avons observé, en effet, qu'en ajoutant à 1 cc. soit de sang, soit d'une solution d'oxyhémocyanine de ces animaux, 2 gouttes de lessive alcaline à 15%, il y a d'abord décoloration, puis prise en gelée moulée et enfin le mélange prend une très belle coloration *mauve*, caractéristique.

c) Crustacés décapodes (Langouste, Homard, Écrevisse). — En opérant toujours de la même façon, soit sur du sang défibriné, soit sur une solution d'oxyhémocyanine des Crustacés précités, nous avons constaté qu'il y avait déco-

loration suivie de prise en gelée moulée et qu'enfin, dans tous les cas, il apparaissait une coloration *rose* analogue à celle que donnent les protéoses et les peptones.

d) Crustacés stomatopodes (Squille). — Le sang de Squille, traité de la même manière, se comporte en tous points comme celui des Crustacés décapodes. Nous avons donc encore ici une réaction du biuret positive, avec coloration *rose*.

Des différences analogues dans la façon dont se comportent les hémocyanines de diverses provenances zoologiques au point de vue de la réaction du biuret sans introduction de cuivre viennent d'être constatées par QUAGLIARIELLO (loc. cit.).

§ 3. Dosage du cuivre dans les sangs hémocyaniques.

La méthode employée consistait essentiellement à détruire la matière organique à chaud par l'action combinée de SO^4H^2 et de NO^3H. Le cuivre était séparé électrolytiquement, transformé en nitrate et dosé colorimétriquement à l'état de ferrocyanure. La description détaillée de cette technique a été donnée par DHÉRÉ (6).

Voici les résultats fournis par quelques essais de contrôle préliminaires :

A 3 cc. environ de blanc d'œuf, nous avons incorporé 1 milligramme de cuivre à l'état de nitrate.

N° de l'analyse	*Cuivre introduit*	*Cuivre retrouvé*
1	1 mgr.	1 mgr.
2	1 »	1 »
3	1 »	1 »
4	1 »	0,99 »
5	1 »	1 »

On voit par ces chiffres que, sur cinq dosages, l'erreur n'a dépassé en aucun cas 1/ 100 de milligramme.

Le tableau I (p. 8-9) contient toutes les déterminations de cuivre que nous avons faites dans des sangs hémocyaniques ; nous y joignons les déterminations effectuées (jusqu'en 1915) par divers auteurs.

Pour la discussion de ces teneurs, dont beaucoup présentent des écarts considérables, nous renvoyons à Dhéré (6 et 7), et nous admettrons, avec cet auteur, que les valeurs ci-dessous représentent approximativement la teneur moyenne en cuivre du sang de chacune des espèces qui y figurent et sur une partie desquelles ont porté nos dosages personnels.

TABLEAU II.

Teneur en cuivre, exprimée en milligr., de 100 cc. de sang.

Mollusques	*Octopus vulgaris*	23,5
	Sepia officinalis	23,7
	Helix pomatia [1]	6,5 à 7,5
Crustacés	*Astacus fluviatilis*	7,0
	Palinurus vulgaris	9.5
	Homarus vulgaris	10,0
	Cancer pagurus	6,0
	Carcinus mœnas	9,0
	Maja squinado	3,5
	Squilla mantis	6,1

[1] Pendant les premiers mois de l'hibernation.

§ 4. Teneur en cuivre de l'hémocyanine d'Escargot.

Par le même procédé analytique (technique de Dhéré), nous avons dosé le cuivre dans une dizaine d'échantillons d'hémocyanine d'Escargot cristallisée, et même recristallisée par dialyse, et provenant de diverses préparations. La prise d'essai a été, dans presque tous les cas, de 1 gr. environ. Les teneurs ont été en moyenne de 0 gr. 25 de Cu p. 100 (en chiffre rond), avec des valeurs extrêmes de 0,239 et de 0,256. Ces chiffres se rapportent uniquement à des échantillons de cristaux desséchés à poids constant dans le vide (au-dessus de chlorure de calcium fondu) à la *température ordinaire*, et devant contenir, par conséquent, une quantité notable d'eau de cristallisation.

CHAPITRE II.

Cristallisation des oxyhémocyanines.

§ 1. Cristallisation de l'hémocyanine d'Escargot.

Nous avons réalisé cette cristallisation de diverses façons :

1° *Cristallisation par dialyse.* — DHÉRÉ a découvert en 1908 que l'hémocyanine d'Escargot *(Helix pomatia)* cristallise aisément par simple dialyse de ses solutions, c'est-à-dire sans addition de sels ni d'alcool, uniquement par soustraction des substances étrangères cristalloïdes (dialysables). Nous avons eu bien des fois l'occassion de répéter les observations de cet auteur, observations qui ont été également confirmées depuis par E. PHILIPPI (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, CIV, 1919).

Au point de vue technique, bornons-nous à dire qu'on peut opérer par exemple sur le sang recueilli en évitant toute introduction de mucus. La dialyse s'effectue très bien dans des sacs de collodion placés à la glacière. Un abondant dépôt cristallin apparaît généralement au bout d'une huitaine de jours. Les cristaux obtenus sont des cristaux squelettes qu'on peut considérer comme provenant d'octaèdres dont l'accroissement s'est fait principalement suivant la direction des trois axes rectangulaires. (Voir la fig. 1, pl. I, dont le cliché m'a été communiqué par M. DHÉRÉ.)

Pour procéder à la *recristallisation*, les cristaux sont séparés des eaux-mères par centrifugation [1], parfaitement

[1] Après centrifugation, on remarque que le dépôt au fond des tubes est formé par une couche d'un beau bleu foncé surmontée d'une couche moins haute d'un gris bleuâtre (gris de perle). Nous avons constaté que cette substance grise, isolée le mieux possible, a même teneur en cuivre que la substance bleue. Elle est aussi

essorés, puis lavés à l'eau distillée dans laquelle ils sont pratiquement insolubles à la température ordinaire et séparés de nouveau par centrifugation. En ajoutant à un volume de sédiment cristallin humide, un volume de solution de chlorure de sodium $n/2,5$, on obtient une liqueur bleu foncé, assez fortement opalescente. Soumise à la dialyse, cette liqueur d'hémocyanine dans le chlorure de sodium en solution $n/5$ environ ne tarde pas à se troubler : dès la fin du second jour, par agitation, on observe des nuages à reflets soyeux. La précipitation des cristaux progresse rapidement ; mais ces cristaux ont le plus souvent des formes peu nettes [1]. Les eaux-mères finissent par être tout à fait incolores.

2° *Cristallisation lente d'une solution saturée, sans addition ni soustraction d'électrolytes.* — Nous avons dit que, dans le sang d'Escargot dialysé, se forme, à partir du 8me jour, par exemple, un abondant précipité de cristaux squelettes d'hémocyanine. Or, si, dès que la sédimentation de ce précipité a lieu, on décante les eaux-mères (encore notablement colorées en bleu) et les introduit dans des tubes en verre d'Iéna placés à la glacière, on obtient une nouvelle cristallisation. Les cristaux en question se déposent à la surface du verre sur toute la hauteur qu'occupe la liqueur. Ils apparaissent habituellement au bout de quelques jours. Comme ils se nourrissent peu à peu, ils acquièrent souvent à la longue des dimensions assez grandes pour que, à l'œil nu, on les distingue individuellement et discerne assez nettement leur forme ; ils offrent alors une belle coloration bleu foncé. Nous avons photographié quelques-unes des formes les plus remarquables qu'on obtient dans ces conditions :

La figure 2 (pl. I), montre des octaèdres dont les angles

---

entièrement cristalline ; mais elle se dissout avec une facilité extrême en présence de traces infimes d'électrolytes.

[1] Nous avons pourtant observé quelquefois qu'il se formait à la longue des aiguilles assez nettes.

sont remplacés par des facettes. A l'examen de cette préparation, on a déjà l'impression qu'il s'agit de troncatures portant sur les angles, non de l'octaèdre régulier, mais bien de l'*octaèdre quadratique*. Dans certains cas, l'hésitation n'était pas permise, l'axe principal étant beaucoup plus court que les deux autres, qui paraissaient égaux. Dans tous les cas, l'examen de la polarisation chromatique a prouvé que ces cristaux étaient *biréfringents* [1].

Sur la figure 3 (pl. II), on observe, à côté de quelques octaèdres (au sens large) non tronqués, des cristaux à douze faces qu'on peut considérer comme des *dihexaèdres* (bipyramides hexagonales). La conformation de chacun de ces derniers cristaux s'expliquerait encore en y voyant une pyramide orthorhombique combinée avec un dôme. Remarquons que tous les cristaux de cette préparation offraient des inégalités de croissance. Disons aussi qu'ils étaient tous biréfringents.

Comme on le voit, tous ces cristaux (dont plusieurs présentent des macles) sont de formes géométriquement bien définies et fort beaux. La solution mère dans laquelle ils ont pris naissance doit sans doute être considérée comme une solution sursaturée (ou au moins saturée), et cela bien qu'on ait affaire à une solution colloïdale. La quantité d'hémocyanine dissoute dans la liqueur étant très petite, il ne peut s'agir d'ailleurs que d'un degré de sursaturation peu élevé ; et c'est pourquoi ces cristaux n'apparaissent qu'au bout d'un certain temps, en petit nombre, et s'accroissent lentement, ce qui leur permet de se développer avec la netteté de formes que l'on constate [2].

---

[1] Nous tenons à exprimer à M. le Dr P. Koller, privat-docent de minéralogie, nos vifs remercîments pour le précieux concours qu'il nous a prêté pour l'étude des formes cristallographiques et des propriétés optiques des cristaux que nous avons obtenus.

[2] L'évaporation spontanée à la température ordinaire, d'une liqueur analogue nous a aussi donné (au bout de quelques semaines) des cristaux octaédriques, bleuâtres, assez bien conformés. La liqueur avait été placée dans une fiole en verre d'Iéna recouverte

3° *Cristallisation en présence de sulfate de soude.* — Lorsqu'on ajoute à une solution de sulfate de soude très étendue un excès de cristaux d'hémocyanine d'Escargot (préparés par dialyse du sang), on voit que ces cristaux se dissolvent abondamment, et on obtient une solution bleu foncé, fortement opalescente. Entre certaines limites de concentration saline, l'hémocyanine se dissout d'autant mieux que la teneur en sel est plus élevée. Supposons que la concentration finale en sulfate de soude soit $n/500$ environ : la liqueur étant filtrée sur filtre rapide (n° 589, de Schleicher et Schüll) aussitôt que la dissolution est effectuée, puis abandonnée au repos, on observe qu'elle devient presque tout de suite très trouble, soit qu'on l'ait placée à la glacière, soit qu'on l'ait maintenue à la température ordinaire (17°) où a eu lieu la dissolution. Après 24 ou 48 heures, on remarque la présence au fond du vase d'un sédiment pouvant avoir quelques millimètres d'épaisseur si la colonne de liqueur est suffisamment haute (12 centimètres, par exemple). Examiné au microscope, le dépôt apparaît formé de longues et fines aiguilles, sans traces de substance amorphe.

La fig. 4 (pl. II) est la reproduction d'une photographie de ces aiguilles.

Au point de vue cristallographique, nous ne pouvons rien dire de bien précis. Nous avons pourtant constaté que la surface de section est quadrangulaire. Les aiguilles de la préparation photographiée semblaient être des prismes ;

---

d'un capuchon de papier ; les cristaux occupaient la surface de la paroi comprise entre le niveau initial et le niveau abaissé de la liqueur.

Remarquons que, dans le cas actuel, les cristaux se sont déposés par évaporation d'une solution d'hémocyanine pratiquement dépourvue d'électrolytes ; on peut se demander si, en présence de quantités notables d'électrolytes, on réussirait également à obtenir l'oxyhémocyanine cristallisée par évaporation de ses solutions.

des aiguilles vues sur d'autres préparations donnaient plutôt l'impression de pyramides doubles très allongées [1].

Ces cristaux sont pratiquement insolubles dans l'eau distillée. Après plusieurs lavages, suivis de séparation par centrifugation, les cristaux formaient une masse bleue, assez compacte ; en leur ajoutant du carbonate de soude $n/50$, en volume équivalent à celui de leur masse, ils ne tardèrent pas à se dissoudre, et il en résulta une liqueur d'un beau bleu foncé.

Pour réussir cette cristallisation, il est indispensable de n'opérer qu'avec des liqueurs très pauvres en sulfate de soude, comme le montrent les résultats consignés dans le tableau suivant :

Concentration en sulfate de soude.	
$\frac{n}{1000}$	: Rien que des aiguilles bien formées.
$\frac{n}{640}$	: Seulement des aiguilles, mais plus fines ; cristallisation homogène.
$\frac{n}{320}$	: La plus forte concentration ne donnant que des aiguilles.
$\frac{n}{160}$	: Cristallisation tardive, peu abondante ; aiguilles, fuseaux, bipyramides hexagonales.
$\frac{n}{80}$	: Seulement des formes en fuseau ; peu de cristaux.
$\frac{n}{40}$	: Quelques fuseaux dans un peu de substance amorphe.

Ainsi, ces cristaux se forment le mieux précisément dans des conditions où ils ne peuvent fixer que de très petites quantités de sulfate de soude ; il est néanmoins remarquable qu'ils prennent naissance dans des eaux-mères

---

[1] En répétant récemment cette expérience, nous avons obtenu, dans plusieurs tubes, uniquement des aiguilles identiques à celles déjà photographiées ; mais nous avons observé aussi quelques autres formes. Dans un tube, il y avait notamment de très nombreux cristaux pyramidaux, à section quadrangulaire, qui possédaient une assez forte biréfringence et appartenaient au système quadratique, comme les cristaux (ceux-ci beaucoup plus gros) de la fig. 2.

relativement assez riches en électrolytes, le sang devant être beaucoup plus déminéralisé pour que le début de la cristallisation apparaisse. Il est probable que, dans ce dernier cas, c'est la réaction alcaline qui s'oppose à la cristallisation.

En dialysant une solution d'hémocyanine dans le sulfate de soude $n/5$ (concentration finale), nous avons observé aussi la formation d'un précipité cristallin constitué uniquement par de fines aiguilles semblables à celles de la fig. 4.

§ 2. Cristallisation de l'hémocyanine de Langouste.

Nous avons utilisé du sang de Langouste défibriné et filtré, qui avait été assez longuement dialysé. En plaçant dans un champ électrique le sérum introduit dans un appareil *ad hoc* [1], on constata que l'hémocyanine se transportait à l'anode où elle se précipitait à l'état amorphe [2]. La portion de la liqueur contenant le précipité fut recueillie à part et additionnée de ¼ de son volume de solution normale de chlorure de sodium ; la concentration saline finale de la liqueur était donc $n/5$. On remarqua que l'hémocyanine se dissolvait presque aussitôt, mais qu'après quelques instants la liqueur se troublait fortement ; elle laissait bientôt déposer un abondant précipité, en même temps que les parois du vase en contact avec la liqueur se couvraient d'un dépôt d'aspect cristallin. L'examen microscopique, pratiqué quelques heures plus tard, montra qu'en effet tout le précipité, tant au fond du vase que sur les parois, était exclusivement constitué par des cristaux qu'on reconnut être des *rhombododécaèdres*, dont beaucoup maclés (fig. 5, pl. III).

---

[1] Cf. Ch. Dhéré, Recherches sur les propriétés physico-chimiques de la gélatine déminéralisée. *Journal de Physiol. et de Pathol. gén.*, XIII, p. 173, et pl. II, fig. 3, 1911.

[2] Tandis que, comme l'a vu Dhéré, l'oxyhémocyanine d'Escargot se dépose, dans ces conditions, à l'état cristallisé.

Pour contrôler la nature de ces cristaux, nous les avons lavés à l'eau distillée (dans laquelle ils sont pratiquement insolubles) jusqu'à élimination à peu près complète du sel (constatée par l'abaissement considérable de la conductivité électrique des eaux de lavage [1]). Les cristaux, soigneusement essorés, furent dissous dans un peu de carbonate de soude $n/25$; la liqueur obtenue était d'un beau bleu, un peu verdâtre, comme le sang de Langouste. Par neutralisation de la liqueur au moyen d'acide chlorydrique très dilué, on détermina une recristallisation abondante.

Précisons et complétons sur quelques points ce qui vient d'être dit : le sérum doit être dialysé suffisamment pour que les électrolytes aient été éliminés en très grande partie. Nous avons utilisé, avec d'excellents résultats, des sérums dialysés de conductivités spécifiques comprises entre 44 et 58 $\times$ 10^{-6}. Si la dialyse est poussée trop loin, tout le sérum se trouble et peut présenter, dans certains cas exceptionnels, des reflets soyeux quand on l'agite. Mais nous n'avons, dans aucun cas, obtenu par simple dialyse des cristaux visibles au microscope. Quand le sérum est trop dialysé [2] ou seulement trop vieux, la cristallisation, par le procédé décrit ci-dessus, se fait très lentement (parfois seulement après quelques jours ou quelques semaines) et les cristaux peuvent être souillés de substance amorphe.

Quand la cristallisation se produit dans de bonnes conditions, on constate ordinairement au bout d'une demi-heure, à partir du moment où a eu lieu la dissolution, l'apparition de nombreux cristaux qui, généralement, ne sont pas des dodécaèdres, mais bien des tétraèdres. Ces tétraèdres, à faces et arêtes courbes, ne constituent jamais

---

[1] Nous avons toujours opéré sur du sang légèrement fluoré après défibrination et filtration ; il était de nouveau filtré avant la dialyse. Au début de la dialyse, on observe l'apparition d'un précipité (ne paraissant pas être de l'hémocyanine) qui doit être éliminé par filtration.

[2] Il n'y a cependant aucun inconvénient à effectuer, en même temps que le transport, la *dialyse électrique* (procédé imaginé par Ch. Dhéré). Les eaux cathodiques se chargent de beaucoup plus d'électrolytes que les eaux anodiques.

qu'une forme instable, transitoire ; on les voit souvent, en moins d'une demi-heure se transformer en dodécaèdres.

Nous avons encore observé, mais très rarement, une autre forme qu'on voit sur la fig. 6 (pl. III). Il s'agit ici du *protoprisme hexagonal* combiné avec un *rhomboèdre inverse* (système *rhomboédrique*).

Ainsi, l'oxyhémocyanine de Langouste est susceptible de cristalliser sous des formes appartenant à deux systèmes différents ; car nous avons constaté, par l'examen de la polarisation chromatique, que les dodécaèdres sont isotropes et doivent, par conséquent, être rattachés au système cubique.

Faisons remarquer qu'avant nos recherches aucune hémocyanine d'Arthropode n'avait été obtenue à l'état cristallisé.

Enfin, ajoutons que, dans son travail publié en 1922, Quagliariello dit : « L'emocianina di *Palinurus* (Langouste) è stata recentemente ottenuta cristallizzata dal Dhéré (Note de Dhéré et Burdel) con un procedimento speciale, che anche io ho applicato con pieno successo ».

CHAPITRE III.

Spectre d'absorption des oxyhémocyanines.

Nous avons étudié les spectres d'absorption *visibles* des oxyhémocyanines par les méthodes *spectrographique* et *spectroscopique*.

§ 1. Déterminations spectrographiques.

Commençons par décrire notre *technique spectrographique* :

Nous avons utilisé un spectrographe de grande luminosité (construit par R. Fuess) à deux gros prismes (de 43 mm. de hauteur), en flint lourd très dispersif ($n_D = 1,75$), ayant angle réfringent de 60°. L'objectif du tube collimateur a une ouverture relative égale à f : 4 ; pour l'objectif de la chambre photographique, cette ouverture est réduite à f : 6. La longueur du spectre, de la raie du potassium $\lambda = 767\ \mu\mu$ à la raie du cadmium (ou plutôt de l'air) dite Cd. 8 ($\lambda = 399\ \mu\mu$), est de 72 mm. environ.

Pour toutes les photographies de spectres soit d'émission, soit d'absorption, la largeur de la fente restait invariable et égale à 0,08 mm. Aux deux extrémités de la plaque, on enregistrait un spectre de référence : raies d'émission de l'hélium et du mercure. Les raies de l'hélium étaient fournies par un tube de Geissler, la durée de la pose étant d'une minute. Les raies du mercure étaient fournies par une lampe à arc de mercure, la durée de la pose étant de 30 secondes. La source lumineuse était constituée par une lampe à arc au charbon, munie d'un mécanisme de réglage automatique. Les rayons émis par le cratère du charbon positif, disposé horizontalement, traversaient, avant de passer par la liqueur absorbante, une lentille qui les rendait parallèles. Un obturateur à ressort était placé entre la lentille et le spectrographe, contre la lentille. L'intensité du courant était maintenue au voisinage de 15 ampères. Immédiatement au-dessous du premier spectre de référence, on enregistrait le spectre de la source (spectre témoin), obtenu avec une pose de $^1/_{10}{}^{me}$ de seconde seulement. Pour les spectres d'absorption, la pose a dû être considérablement allongée ; elle était toujours de plusieurs minutes. Nous préciserons la durée de cette pose au moment où nous décrirons chacun des spectrogrammes.

Les liqueurs étaient toujours placées dans des cuves de verre à parois parallèles.

Comme plaques, nous avons utilisé exclusivement des plaques anti-halo « Wratten M » (panchromatiques).

Passons, maintenant, à la *description des spectrogrammes d'absorption* qui ont été obtenus avec les oxyhémocyanines d'Escargot, de Seiche, de Langouste et de Homard .

1° *Oxyhémocyanine d'Helix pomatia.* — Nous avons photographié, d'une part, le spectre du sang aéré et, d'autre part, le spectre de l'oxyhémocyanine cristallisée dissoute dans de l'eau contenant différents électrolytes.

La figure 7 (pl. IV) est la reproduction d'un spectrogramme d'oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée en solution dans NaCl $n/5$ (concentration finale). Cette liqueur contenait 8 mgr. de cuivre par 100 cc.

Elle fut interposée successivement sous les épaisseurs suivantes : 45 mm., 50 mm., 65 mm., 70 mm., et 75 mm. La pose fut uniformément de 4 minutes. Cette figure montre qu'il y a, sous une épaisseur convenable (50 mm.), une absorption portant d'une façon prédominante, dans la continuité du spectre, sur certains rayons des régions jaune et jaune verdâtre, sans que l'on puisse d'ailleurs observer de bande d'absorption nette. L'absorption est insensible pour les rayons moins réfrangibles que λ 585 (la raie D : λ 589 est donc bien en dehors) ; elle devient forte de λ 575 à λ 533, et se continue, plus ou moins prononcée, jusqu'à 461 où elle est complète. Pour les épaisseurs supérieures (55 à 75 mm.), seuls sont transmis soit les rayons orangés et rouges [1], soit les rayons rouges. La remarquable transparence pour les rayons rouges (de même que l'opacité pour

[1] A vrai dire, pour l'épaisseur 55 mm., on entrevoit encore sur le cliché une bande de transparence occupant le vert bleuâtre et une grande partie du bleu ; mais cette bande est si faible qu'on peut la considérer comme négligeable ; elle n'a pu être rendue par la reproduction.

les rayons bleus) se trouve en relation avec l'opalescence de la liqueur, comme on le verra plus loin. Dans le cas présent, nous avons certainement affaire à un spectre d'absorption de nature complexe, où les phénomènes de réflexion lumineuse sur les grosses particules colloïdales interviennent à côté des propriétés d'absorption sélective de la molécule d'oxyhémocyanine.

Le sang d'Escargot, qui possède une opalescence comparable à celle de l'hémocyanine dissoute dans le NaCl $n/5$, ne présente pas de bande d'absorption plus nette. La figure 8 reproduit des spectres obtenus avec du sang d'Escargot filtré. Le premier spectre d'absorption, qu'il eût été préférable d'enregistrer sous une épaisseur un peu moins forte, ne laisse qu'à peine entrevoir l'existence d'une bande extrêmement nébuleuse (il y a une lueur de 520 à 470 $\mu\mu$ environ). Mais ce spectrogramme est surtout instructif parce qu'il montre combien, ici encore, la transparence est considérable pour la plage rouge.

Quand on introduit des cristaux d'hémocyanine d'Escargot humides (préparés par dialyse) dans des solutions très étendues de carbonate de soude, ils se dissolvent rapidement et abondamment en fournissant des liqueurs limpides (ou à peine opalescentes). La figure 9 (pl. V) est la reproduction du spectrogramme de l'oxyhémocyanine cristallisée en solution dans $CO^3Na^2 n/100$ (concentration finale).

Teneur en cuivre de la liqueur : 25 mgr. p. 100 cc. Epaisseurs consécutives en millimètres : 17,5 ; 20 ; 22,5 ; 25 ; 27,5 ; 30 ; 32,5 ;

La transparence de la liqueur étant bien plus grande, le temps de pose a été réduit à 2 minutes.

Sur cette figure, on voit *une bande d'absorption très accentuée*, s'étendant, pour une largeur moyenne (épaisseur : 22,5 mm), entre les radiations λ 610 et λ 532 environ. Le rouge et l'orangé sont bien transmis, de λ 714 à λ 610 ; il en est de même pour le vert et le bleu de λ 531 à λ 443. La transparence pour les deux plages extrêmes reste à peu

près la même (en tenant compte du mode de dispersion) jusqu'à l'épaisseur la plus forte inclusivement. Sous l'épaisseur de 32.5 mm., la bande d'absorption est encore comprise entre une plage rouge et une plage bleue assez étendues mais peu lumineuses.

2° *Oxyhémocyanine de Sepia officinalis.* — Nous avons opéré sur du sang qui avait été recueilli et additionné de fluorure de sodium neutre (2 p. 100) 48 heures environ auparavant. Ce sang était dans un état de conservation parfaite (coloration d'un bleu vif, aucune odeur anormale). Il fut filtré pour séparer les globules blancs agglutinés (syncytium) et le précipité de fluorure de calcium. Il était alors relativement bien limpide. On y fit passer un courant d'oxygène pour transformer en oxyhémocyanine l'hémocyanine réduite qu'il aurait éventuellement contenue [1] et on le soumit à la spectographie sous les épaisseurs consécutives de 25, 30, 35, 40, 45 et 50 millimètres. Le temps de pose fut uniformément de 3½ minutes. La teneur en cuivre était de 23.7 mgr. p. 100 cc.

On voit sur la figure 10 que cette oxyhémocyanine présente une *bande d'absorption intense et franchement délimitée* (épaisseurs 30, 35 et 40 mm.). Sous les épaisseurs les plus fortes, la plage rouge étant complètement absorbée, il n'y a plus de limite visible de ce côté ; mais, à l'autre extrémité du spectre, la plage bleue continue à être transmise avec une remarquable intensité. Même sous l'épaisseur de 50 mm., les radiations bleues (de λ 494 à λ 458), quoique très affaiblies, ne sont pas interceptées. En somme, pour ce qui est de la transmission des radiations extrêmes, nous avons ici précisément l'inverse de ce que nous avons constaté avec le sang d'Escargot et avec l'oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée dissoute dans NaCl $n/5$.

La transparence prédominante pour les rayons de la

---

[1] Plus exactement, pour abaisser au minimum la fraction d'hémocyanine non oxygénée.

plage bleue a pour conséquence le déplacement de l'axe de la bande d'absorption du côté du rouge par rapport à l'axe de la bande de l'oxyhémocyanine d'Escargot dissoute dans CO^3Na^2 $n/100$ (qui absorbe à peu près également les rayons des deux extrémités, comme nous l'avons vu). Avec cette dernière solution, l'axe correspondait à λ 571 environ ; tandis que, pour l'oxyhémocyanine de Seiche, l'axe correspond à λ 581 environ, la bande d'absorption étant comprise entre λ 612 et λ 550 (épaisseur 30 mm.).

3° *Oxyhémocyanine de Palinurus vulgaris.* — Sang défibriné, filtré et fluoré aussitôt après avoir été recueilli ; puis refiltré au moment de l'emploi. Ce sang (sérum) relativement bien limpide, d'un bleu ardoisé, ne semblant pas contenir de tétronérythrine, avait une teneur en cuivre de 9 mgr. p. 100 cc. Sur la figure 11 (pl. VI), on voit le spectre d'absorption de ce sang interposé sous les épaisseurs de 60, 70, 80 et 90 millimètres, le temps de pose restant uniformément de 2 minutes seulement. Avec cette oxyhémocyanine aussi, nous avons *une bande d'absorption bien distincte* qui présente sensiblement même localisation dans le spectre que la bande de l'oxyhémocyanine d'Escargot dissoute dans CO^3Na^2 $n/100$. (Pour la bande photographiée sous l'épaisseur 70 mm., l'axe est λ 572 ou λ 573.)

4° *Oxyhémocyanine de Homarus vulgaris.* — Sang défibriné, filtré, fluoré et refiltré au moment de l'emploi. Ce sérum était d'un beau bleu, à nuance ardoisée, et ne semblait pas contenir de tétronérythrine [1]. Comme il était assez opalescent, nous l'avons additionné, goutte à goutte, d'une solution de carbonate de soude jusqu'à ce qu'il fût devenu suffisamment limpide [2]. (Il a fallu ajouter 10 gout-

---

[1] Nous avons choisi cet échantillon parmi cinq que nous possédions. Les quatre autres, provenant chacun d'un animal différent, contenaient tous, en plus ou moins grande quantité, de la tétronérythrine.

[2] On peut de la même façon rendre limpide du sang d'Escargot, mais à condition d'opérer toujours sur du sang préalablement

tes de $CO^3Na^2 n/1$, pour 38 cc. de sérum.) La teneur en cuivre n'a pas été déterminée. Le temps de pose étant de 4 minutes, on entrevoyait à peine la bande sous l'épaisseur de 40 mm. ; elle devenait nette sous l'épaisseur de 50 mm., et apparaissait très large sous l'épaisseur de 60 mm. Ce spectrogramme présentant la plus grande analogie avec celui du sérum de Langouste, nous croyons inutile d'en publier la reproduction.

§ 2. Observations spectroscopiques.

Avant d'enregistrer photographiquement les spectres d'absorption, nous procédions toujours à l'examen spectroscopique des liqueurs dans les mêmes conditions d'éclairage. Nous pouvons dire, d'une façon générale, que nos observations oculaires correspondent aux résultats spectrographiques [1]. C'est ainsi que nous avons vu, avec une parfaite netteté, la bande d'absorption de l'oxyhémocyanine dans le cas d'une solution de cristaux d'oxyhémocyanine dissous dans CO^3Na^2 $n/100$ et dans le cas des sangs de Seiche, de

---

décalcifié ; autrement, il y a formation de carbonate de chaux qui augmente l'opalescence.

[1] Pour ces observations visuelles, nous utilisions un excellent spectroscope à vision directe. La correspondance dont nous parlons existait en ce sens qu'avec le spectroscope, nous parvenions à voir les bandes d'absorption avec presque le même aspect que celui rendu par la photographie ; mais cela sous des épaisseurs du pigment dissous et avec des largeurs de fente du collimateur différentes. Au moyen du spectroscope, nous pouvions très bien voir une bande, alors que la photographie n'enregistrait encore aucun assombrissement perceptible. Ce sont là des remarques qu'on a toujours lieu de faire quand on compare des déterminations visuelles à des déterminations spectrographiques qui dépendent tellement de la durée de la pose. De plus, la sensibilité chromatique de la plaque photographique, quelle que soit sa préparation, diffère beaucoup de celle de la rétine ; et, même en utilisant des plaques aussi parfaites que les panchromatiques Wratten M (qui nous ont semblé incontestablement supérieures à toutes les autres marques que nous avons essayées), il faut compter avec les minima de sensibilité de l'émulsion pour certaines radiations.

Langouste et de Homard (ce dernier additionné d'un peu de carbonate de soude , comme nous l'avons déjà dit).

Nous avons examiné, de plus, du sang d'Écrevisse défibriné, contenant 9 mgr. de cuivre par 100 cc. Ce sang (sérum) était limpide et présentait une couleur rose légèrement brunâtre par transmission, bleu ardoisé par réflexion L'observation sous diverses épaisseurs (jusqu'à 100 mm.) ne permet pas de distinguer nettement la bande de l'oxyhémocyanine ; on a pourtant l'impression qu'il doit y avoir une bande dans le jaune. Afin de mieux voir cette bande d'absorption, nous avons procédé à l'extraction de la tétronérythrine au moyen d'éther, suivant les indications de Jolyet et Regnard. Le sang est doucement agité dans un entonnoir à séparation avec son volume d'éther. Après quelques heures de repos, on observe trois couches : le liquide inférieur, franchement coloré en bleu ; une couche moyenne, formée par un coagulum blanc-jaune ; enfin la couche d'éther, colorée en jaune [1]. Le sérum d'Écrevisse, ainsi débarrassé de la tétronérythrine est, après filtration, limpide et d'un bleu très légèrement nuancé de vert. Une couche de 75 mm. d'épaisseur montre bien nettement la bande caractéristique de l'oxyhémocyanine.

§ 3. Discussion des résultats et conclusions.

Il résulte de nos recherches spectrographiques et spectroscopiques que les *oxyhémocyanines des Mollusques gastéropodes (Escargot) ou céphalopodes (Seiche) ainsi que des Crustacés marins (Langouste et Homard) ou d'eau douce (Écrevisse) présentent toutes, quand on examine leurs solutions dans des conditions convenables de concentration et de milieu, une bande d'absorption nette et bien intense, dont l'axe est situé dans le jaune (pour une largeur moyenne de la bande).*

---

[1] L'extrait éthéré présente les bandes caractéristiques de la tétronérythrine.

Cette bande a échappé à la plupart des observateurs : Rabuteau et Papillon (1873), Jolyet et Regnard (1877), Fredericq (1878), Halliburton (1885), Mac Mun (1885), Griesbach (1891), Heim (1892), Griffiths (1897), Hénocque [1] (1897), Couvreur (1901), Lewin et ses collaborateurs (1907). Elle avait d'abord complètement échappé aussi à Krukenberg (1880) ; mais un examen plus attentif lui permit de constater, en opérant avec du sang d'Escargot, que les rayons jaunes sont plus fortement absorbés que les autres (1882).

En reprenant l'étude spectroscopique du sang d'Escargot, Gautrelet (1903) dit avoir observé une large bande obscure dont les bords manquent de franchise.

Il y a lieu de remarquer, croyons-nous, que les observations de Krukenberg et de Gautrelet ne semblent avoir porté que sur le sang d'Escargot. Or, avec ce sang, très opalescent, tout ce qu'on voit au spectroscope, c'est ce que montre le spectrogramme reproduit fig. 7, c'est-à-dire un assombrissement prononcé au voisinage de la raie D[2] ; on ne distingue pas nettement une bande.

En examinant le sang d'Élédone, Kobert (1903) devait se trouver dans des conditions bien meilleures[3] ; mais,

---

[1] La bande en question ne doit pas être confondue, en effet, avec une bande décrite et figurée par Hénocque, bande dont le maximum d'intensité tombait sensiblement sur la raie E (λ 527 $\mu\mu$) et qui ne correspond à rien de ce que nous avons observé. Cette bande avait été vue par Hénocque en examinant un échantillon de sang de Squille « d'une coloration bleue pâle très franche, après exposition à l'air ». L'auteur a considéré ce spectre comme si typique et si caractéristique qu'il le donne comme étant le spectre général de l'oxyhémocyanine dans l'article qu'il a publié, en 1903, dans le *Traité de Physique biologique de d'Arsonval-Marey*.

[2] Uniquement ou surtout à droite de D, suivant le degré d'épaisseur.

[3] A moins qu'il n'ait fait porter ses observations sur le sang brut, immédiatement après la saignée. Vlès (1913) a montré, en effet, que le sang brut de Poulpe, observé dans ces conditions, a des propriétés spectrales très différentes de celles du sang centri-

d'après ce qu'il dit, on a l'impression qu'il a seulement entrevu assez vaguement cette bande. Nous croyons donc pouvoir dire que ce sont nos recherches qui établissent l'existence et la généralité de cette bande des oxyhémocyanines, bande dont le premier indice a été découvert et signalé par KRUKENBERG.

Si nous avons réussi à voir et à photographier cette bande avec une si grande netteté, c'est que nous nous sommes placé dans des conditions tout particulièrement favorables pour cet examen : Emploi 1° de solutions d'oxyhémocyanine suffisamment limpides, 2° de couches liquides riches en pigment (si riches, parfois, qu'elles semblaient opaques avec un éclairage ordinaire), 3° d'une source lumineuse extrêmement intense, 4° de solutions d'oxyhémocyanine ne contenant pas de tétronérythrine en quantité appréciable (cas des sangs de Crustacés décapodes où l'échantillon choisi était tel ou privé de tétronérythrine par un traitement préalable approprié).

Nous avons dit que l'axe de la bande d'absorption est dans le jaune ; mais, même en considérant uniquement des bandes de largeur moyenne, l'axe n'occupe pas dans le spectre une situation invariable. *D'après nos déterminations, l'axe de cette bande coïncide, suivant les cas, avec des longueurs d'onde comprises entre 571 et 581 μμ, pour des solutions limpides et de réaction alcaline.*

A quoi ces variations sont-elles dues? Il y a lieu, assurément de tenir compte de la composition en électrolytes qui exerce une influence considérable sur la transparence relative pour les rayons des plages extrêmes. Ainsi, une augmentation de la limpidité, en rendant la liqueur plus transparente pour les rayons de la plage bleue, a pour effet de déjeter l'axe de la bande du côté des grandes longueurs

---

fugé. Mais, comme, au début de l'exposé de ses recherches, KOBERT parle de la centrifugation du sang d'Élédone, il se peut fort bien que cet auteur ait opéré sur du sang centrifugé, ainsi que nous sommes porté à le supposer.

d'onde. Mais nous croyons que *ces variations dans la situation de l'axe dépendent non seulement de la composition de la liqueur en électrolytes, mais aussi de la provenance zoologique du pigment.*

Pour avoir une démonstration entièrement satisfaisante de cette dernière influence, il aurait fallu pouvoir constater des déplacements de l'axe en examinant diverses oxyhémocyanines dans des milieux de composition identique. Nous n'avons pas pratiqué de tels examens comparatifs avec le spectroscope ; mais, en comparant, précisément dans des conditions de milieu identiques, la couleur des solutions de diverses oxyhémocyanines, nous avons observé des différences de nuance très nettes, différences qui doivent probablement se traduire dans la position de la bande d'absorption. Nous nous croyons donc autorisé à interpréter en partie les déplacements d'axe que nous avons constatés en invoquant l'influence, très vraisemblable, de l'origine zoologique du pigment. Nous ferons cependant remarquer que des oxyhémocyanines qui, à bien des égards, sont très dissemblables, comme celle de Langouste et celle d'Escargot, peuvent, dans certains milieux, présenter des spectres d'absorption tout à fait analogues. C'est ce que prouve, d'une façon frappante, la comparaison des spectrogrammes 11 et 12 (pl. VI) [1].

Les résultats que nous avons publiés dans notre Note de 1913, ceux communiqués peu après par VLÈS, enfin les autres résultats que nous venons d'exposer et que nous n'avions pu consigner dans notre Note, faute de place, forment un ensemble bien concordant. L'étude qu'a faite VLÈS de la question, bien que limitée au sang de Poulpe, présente un intérêt tout spécial, en ce quelle a été effectuée par la méthode spectrophotométrique. L'auteur a exprimé graphiquement les valeurs qu'il a obtenues par un très grand nombre de mesures. Il a trouvé que le sommet de la bande est très voisin de λ 573 (cas du sang centrifugé).

---

[1] Cristaux d'oxyhémocyanine d'Escargot préparés par dialyse et dissous dans NaCl $n/5$ + 4 cc. p. 100 de CO^3Na^2n (= CO^3Na^2 $n/25$). Liqueur contenant 8 mgr. de cuivre p. 100 cc. Epaisseurs consécutives : 50, 60, 70 et 80 millimètres.

Cette étude spectrophotométrique vient d'être reprise et beaucoup étendue par QUAGLIARIELLO (1922). Le physiologiste italien a fait porter ses observations sur l'oxyhémocyanine de plusieurs Mollusques *(Octopus vulgaris* et *macropus, Eledone moschata, Sepia officinalis)* et de plusieurs Crustacés *(Maja squinado, Palinurus vulgaris, Homarus vulgaris)*. Comme il le fait remarquer, ses résultats correspondent en substance à ceux que nous avions publiés.

§ 4. Spectre d'absorption ultraviolet.

Nous terminerons en disant quelques mots de ce spectre qui a été découvert par DHÉRÉ, en 1908. Les observations de cet auteur ont été faites sur du sang et sur des solutions d'oxyhémocyanine recristallisée d'Escargot et de Poulpe, ainsi que sur du sang et sur des solutions d'oxyhémocyanine précipitée par dialyse de Langouste et d'Écrevisse.

Nous avons repris l'étude en question dans le cas de l'oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée (liqueurs de teneur en cuivre exactement déterminée), dans le cas de solution d'oxyhémocyanine d'Éledone et de Seiche précipitée par dialyse et enfin dans le cas d'une solution d'oxyhémocianine de Langouste recristallisée.

Disons immédiatement que tous ces spectres sont remarquablement analogues ; ils présentent tous *deux bandes obscures* qui, pour une largeur moyenne (oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée, par exemple, dissoute dans de l'eau contenant une trace d'acide acétique), sont *comprises entre les radialions λ 293 et 263 $\mu\mu$ (axe = 278) et entre λ 364 et λ 328 $\mu\mu$ (axe = 346)*.

Nos recherches furent effectuées au moyen d'un grand spectrographe à système optique en quartz, pourvu de tous les accessoires appropriés. Pour la description de ces appareils et pour les conditions photographiques, nous renvoyons aux publications de Ch. DHÉRÉ [1].

---

[1] Consulter spécialement : CH. DHÉRÉ, *Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultraviolets par les albuminoïdes, les protéides et leurs dérivés.* Un volume de 142 pages (62 figures), Fribourg, 1909.

Nous donnons, à titre de spécimens, les reproductions de deux spectrogrammes (voir fig. 13 et 14, pl. VII) : celui du sang de Seiche et celui de l'oxyhémocyanine de Langouste.

Le sang de Seiche utilisé était précisément celui qui avait déjà servi pour la photographie du spectre visible ; mais, dans le cas actuel, il avait préalablement été dilué dans le rapport de 1 à 10 (1 partie de sang + 9 parties de carbonate de soude $n/100$). Les épaisseurs consécutives furent en millimètres : 0 ; 1,2 ; 2,4 ; 3,6 ; 4,8 ; 7,2 ; 8,4 ; 9,6 ; 10,8 ; 12 ; 13,2. La bande sur λ 278 était parfaitement nette sous l'épaisseur de 2 mm. 4 et celle sur λ 346 sous l'épaisseur de 9 mm 6. Rappelons que ce sang contenait, avant dilution, 23 mgr. 7 de cuivre par 100 cc.

Le spectre de l'oxyhémocyanine de Homard correspond sensiblement à celui du sang de Seiche, et nous pouvons donc admettre que les *oxyhémocyanines, quelle que soit leur provenance zoologique, possèdent, dans l'ultraviolet, un spectre commun, à 2 bandes.*

APPENDICE

Nous avons exposé au chap. I, page 7, qu'il était possible de déceler la présence du cuivre dans les sangs hémocyaniques, à l'aide du réactif à la formaldoxime, qui donne, avec les solutions très diluées des sels de cuivre, et en présence d'un petit excès de solution de soude ou de carbonate de soude, une belle coloration violette.

Avant d'appliquer ce réactif à nos recherches, il importait d'établir quelles sont les concentrations des lessives alcalines permettant d'obtenir la coloration violette la plus intense et la plus durable.

Pour faire ces essais, nous nous sommes servi d'un réactif dont la formule a été donnée par BACH [1] et qui se prépare de la manière suivante :

Formaldéhyde à 35% neutre (Kahlbaum)	8,5 cc.
Chlorhydrate d'hydroxylamine (Kahlbaum)	7,0 gr.
Eau distillée	6,0 cc.

Ce réactif était préalablement exactement neutralisé au moyen de soude. Employé seul, il ne donnait pas, avec les solutions pures des sels de cuivre, une coloration violette, mais les colorait seulement en jaune.

La solution de sel de cuivre utilisée était préparée en dissolvant du cuivre pur dans de l'acide nitrique et en débarrassant le nitrate formé de l'excès d'acide, par évaporation de celui-ci dans une cloche à vide au-dessus de potasse caustique. Le sel pur ainsi obtenu était dissous dans de l'eau distillée, à raison de 1 partie de cuivre pour 20.000 parties d'eau.

A. — Réaction en présence de soude caustique :

Dans 4 tubes à essai portant les numéros 1, 2, 3, 4 nous placions 2 cc. de la solution de nitrate de cuivre et une goutte de formaldoxime. Celle-ci produisait instantanément une coloration jaune qui devenait brune au bout de 1 minute. Enfin chaque tube recevait en outre l'addition d'une solution de soude caustique norm. en quantité variable pour les divers tubes.

---

[1] BACH. *C. R. Acad. des Sciences, Paris,* 1899 (1), p. 363.

TABLEAU I.

AU BOUT DE	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3	TUBE 4
	2 cc. sol. $(NO^3)_2Cu$ 1/20000 + 1 goutte formaldoxime.	→ idem.	→ idem.	→ idem.
	coloration jaune instantanée, brune au bout de 1 m.	→ »	→ »	→ »
	+ 1 goutte NaOH norm.	+ 2 gouttes NaOH norm.	+ 3 gouttes NaOH norm.	+ 4 gouttes NaOH norm.
2 minutes	belle coloration violette.	→ idem.	→ idem.	coloration d'abord verte, puis bleue et enfin violette au bout de 3 min.
30 minutes	sans changement.	sans changement.	sans changement.	légère altération de la couleur.
1 heure	» »	» »	» »	commence à pâlir.
2 heures	» »	» »	» »	presque décoloré.
5 heures	» »	à peu près décoloré.	décoloré.	décoloré.

Des résultats consignés dans le tableau I, il ressort bien nettement qu'en ajoutant à 2 cc. d'une solution de nitrate de cuivre à 1/20000 une goutte de réactif à la formaldoxime et de la soude caustique, la coloration obtenue est la plus belle lorsque la réaction a lieu en présence d'une goutte de solution de soude caustique normale.

B. — Réaction en présence de carbonate de soude :

Pour rechercher l'influence de la concentration de la solution de carbonate de soude, nous avons procédé d'une façon analogue, en plaçant dans 4 tubes, 1 cc. de solution nitro-cuprique 1/20000, une goutte de réactif à la formaldoxime et des quantités de solution de carbonate de soude norm. variables pour les divers tubes.

TABLEAU II.

AU BOUT DE	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3	TUBE 4
	2 cc. sol. $(NO^3)_2Cu$ 1/20000 + 1 goutte formaldoxime.	→ idem.	→ idem.	→ idem.
	+ 1 goutte CO^3Na^2 norm.	+ 2 gouttes CO^3Na^2	+ 3 gouttes CO^3Na^2	+ 4 gouttes CO^3Na^2.
2 minutes	col. violette moins forte que pour le tube 1 du tableau I.	col. violette un peu moins forte que celle du tube 2, tableau I.	col. violette.	col. violette.
30 minutes	commence à pâlir.	sans changement.	sans changement.	sans changement.
1 heure	partiellement décoloré.	» »	» »	» »
2 heures	à peu près décoloré.	» »	» »	» »
5 heures	décoloré.	partiellement décoloré.	partiellement décoloré.	» »

Des résultats exposés dans le tableau II, nous pensons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

1° Le carbonate de soude se prête aussi bien que la soude caustique à l'obtention d'une belle coloration violette.

2° La réaction en présence de carbonate de soude est la plus belle et la plus stable lorsque le carbonate est en concentration correspondant à environ 1/10 norm. Cette condition se trouve remplie lorsqu'on ajoute à 2 cc. d'une solution d'un sel de cuivre à 1/20000, 4 gouttes de solution de carbonate norm. et 1 goutte de solution de formaldoxime.

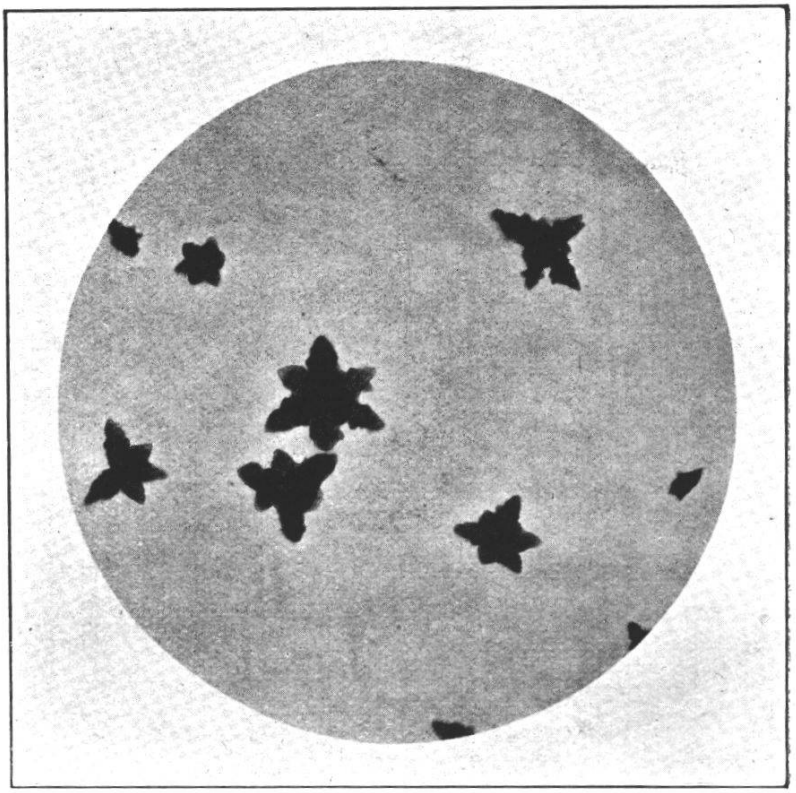

Fig. 1. — Cristaux d'oxyhémocyanine d'Escargot obtenus par dialyse du sang.

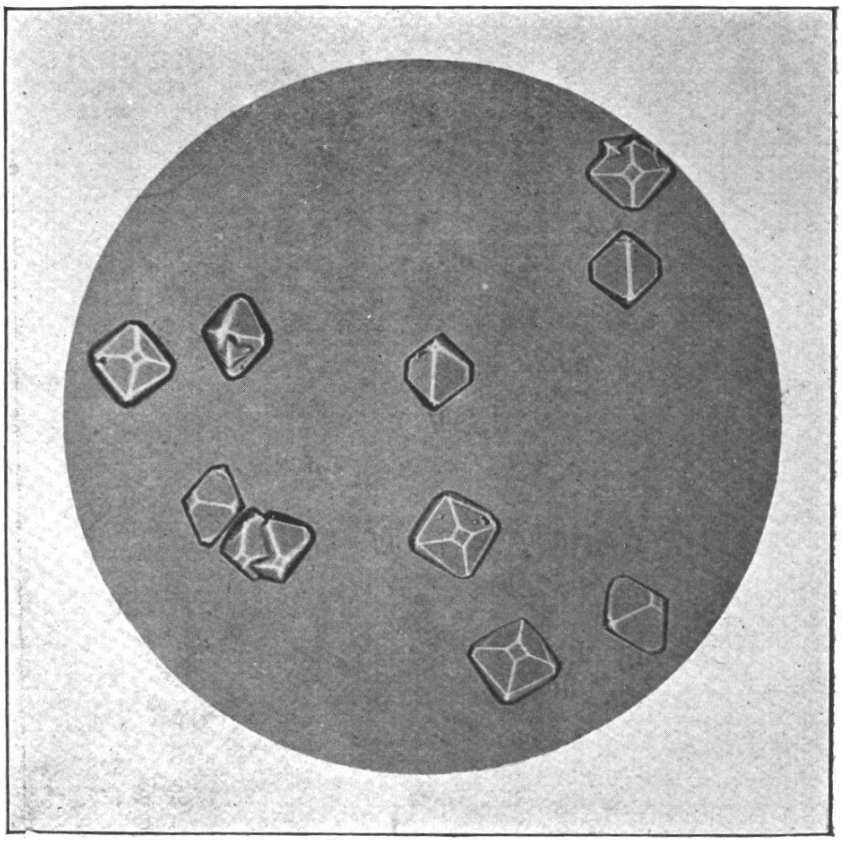

Fig. 2. — Cristaux d'oxyhémocyanine d'Escargot formés lentement dans une solution légèrement sursaturée.

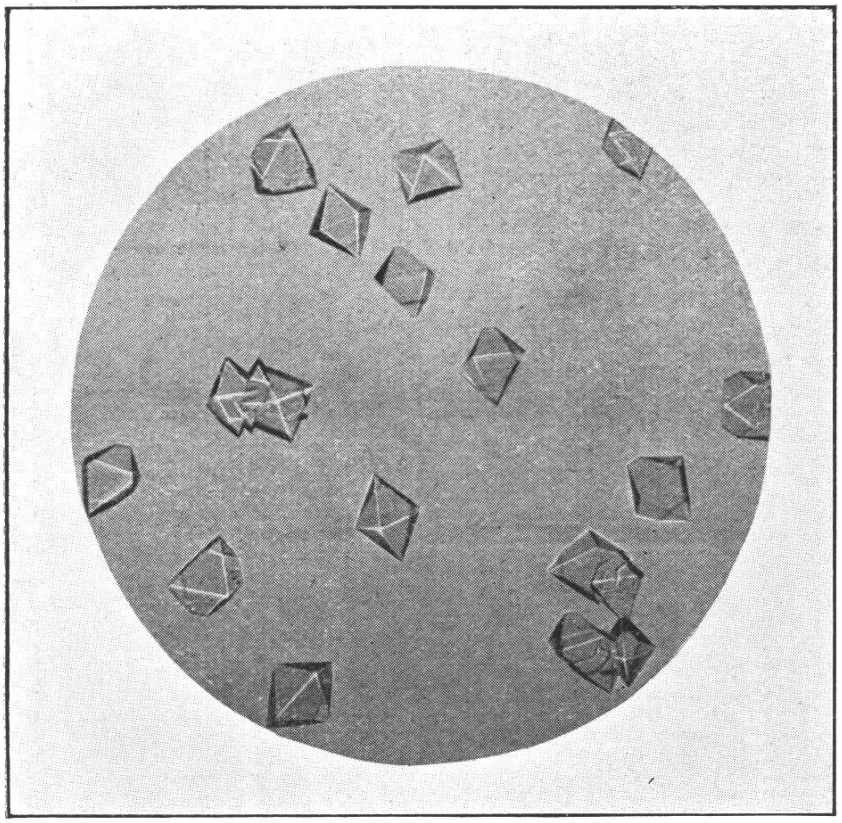

Fig. 3. — Cristaux d'oxyhémocyanine d'Escargot formés lentement dans une solution légèrement sursaturée.

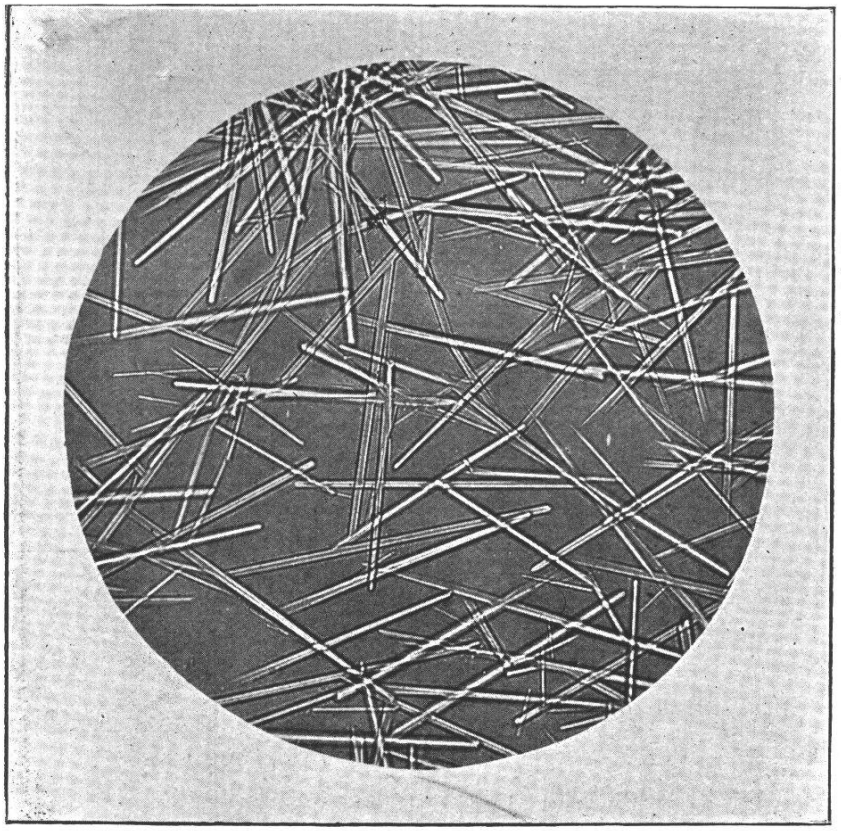

Fig. 4. — Cristaux d'oxyhémocyanine d'Escargot formés en présence de sulfate de soute (concentration saline : n 500).

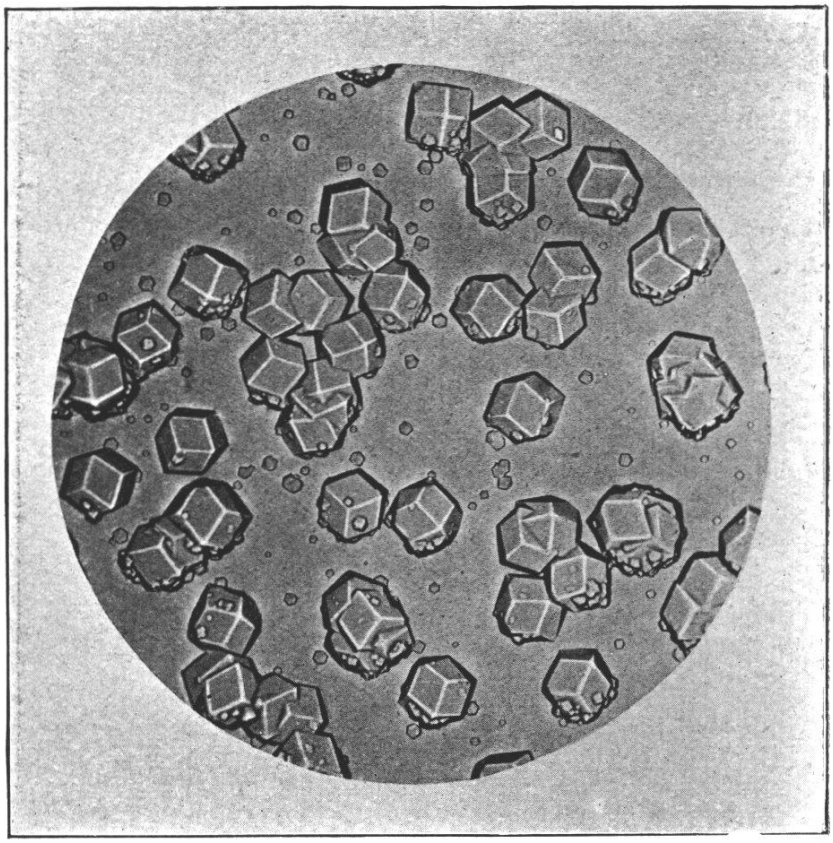

Fig. 5. — Cristaux d'oxyhémocyanine de Langouste formés en présence de chlorure de sodium (concentration saline : $n/5$).

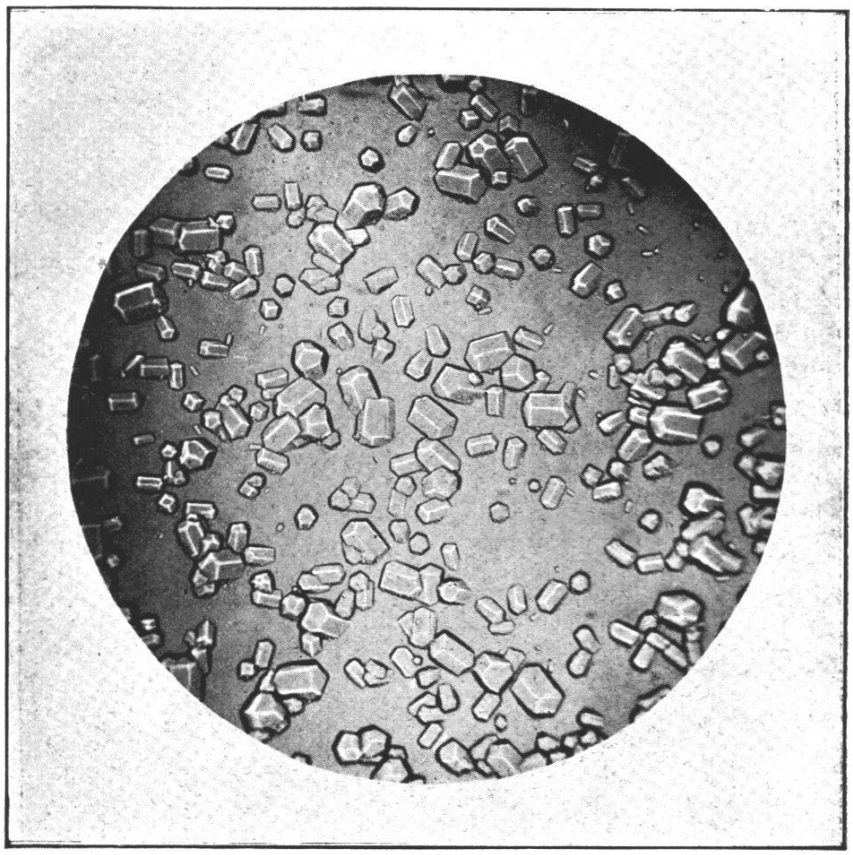

Fig. 6. — Cristaux d'oxyhémocyanine de Langouste formés en présence de chlorure de sodium (concentration saline : $n/5$).

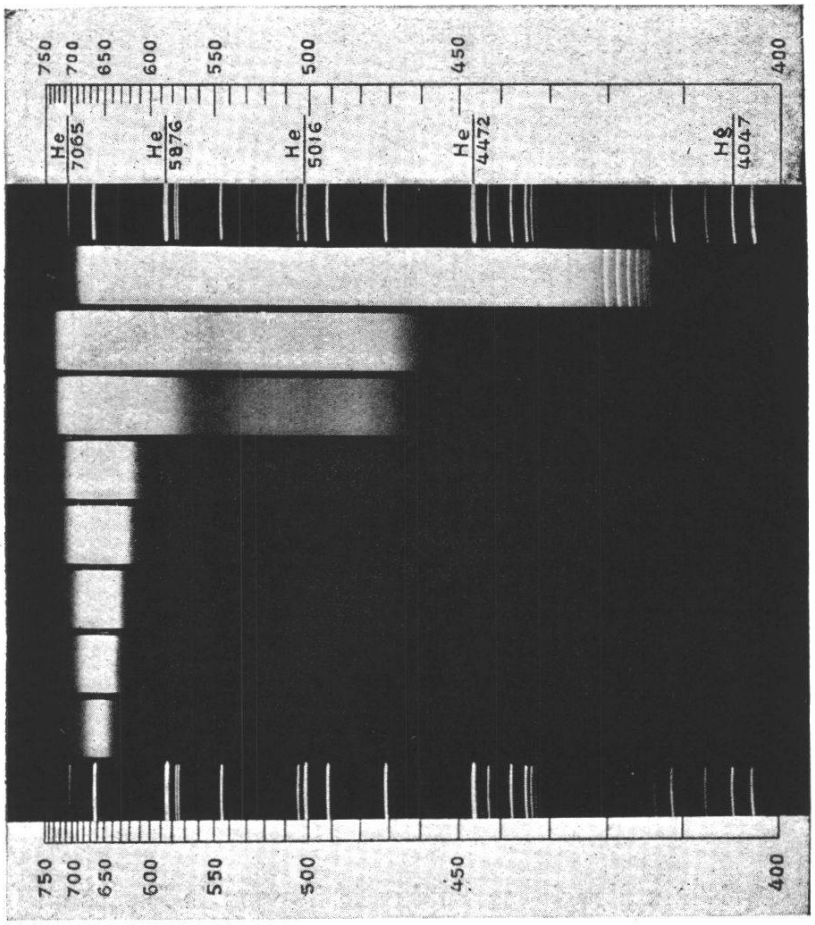

Fig. 7. — Oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée, dissoute dans NaCl $n/5$.

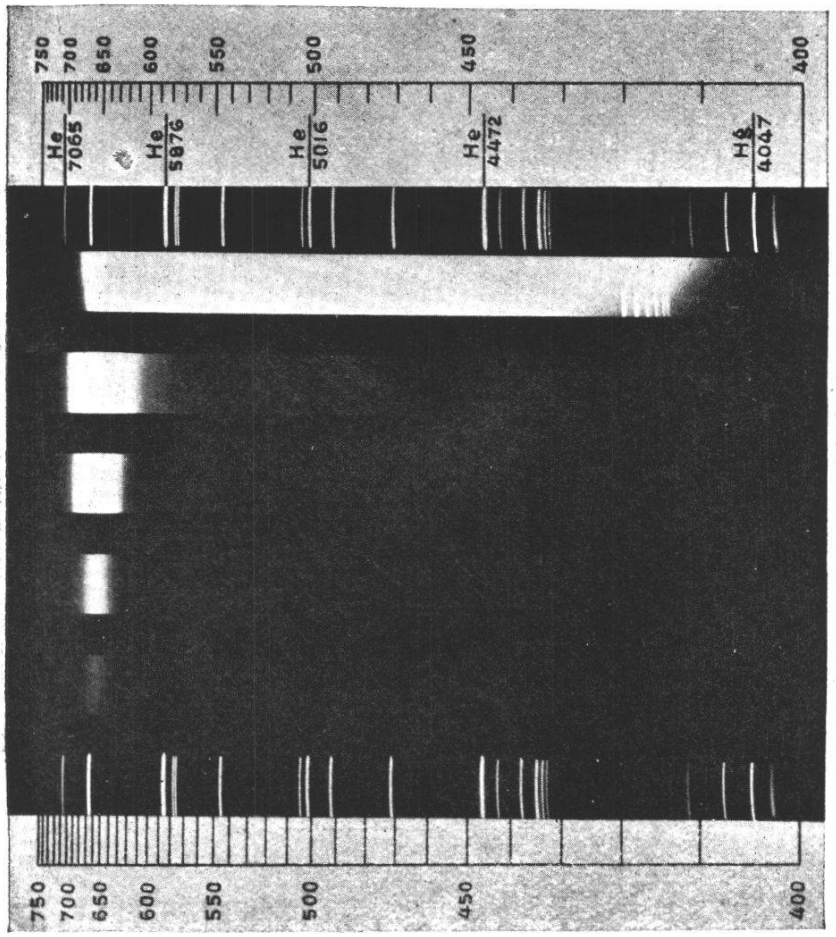

Fig. 8. — Sang d'Escargot filtré.

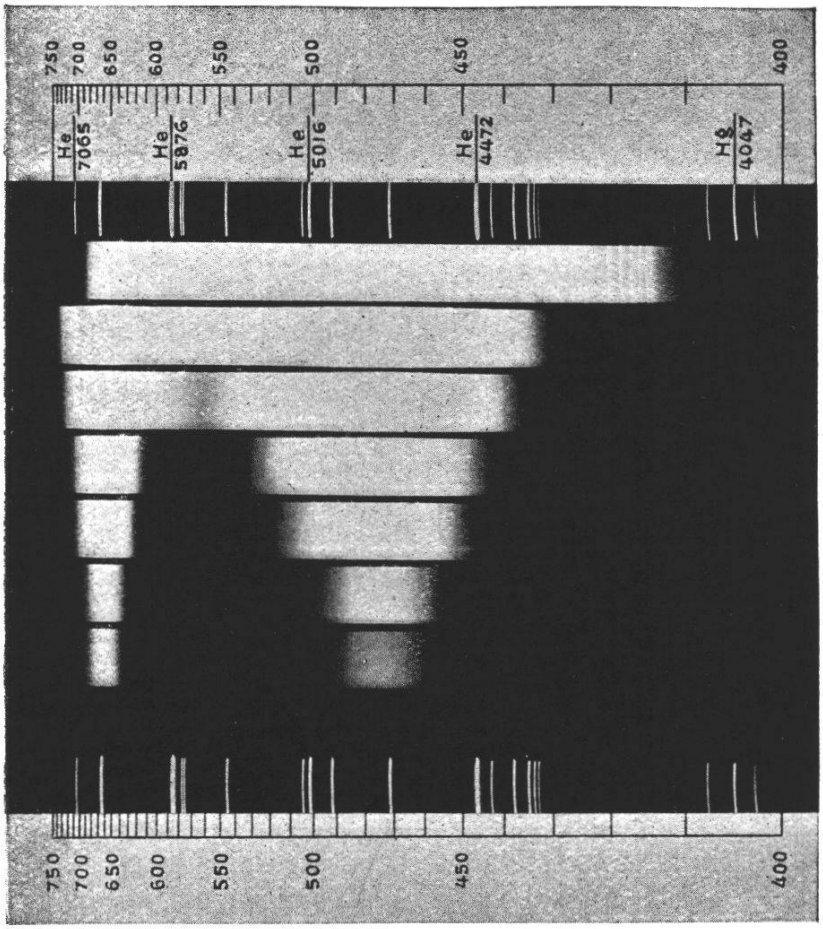

Fig. 9. Oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée, dissoute dans CO^3Na^2 $n/100$.

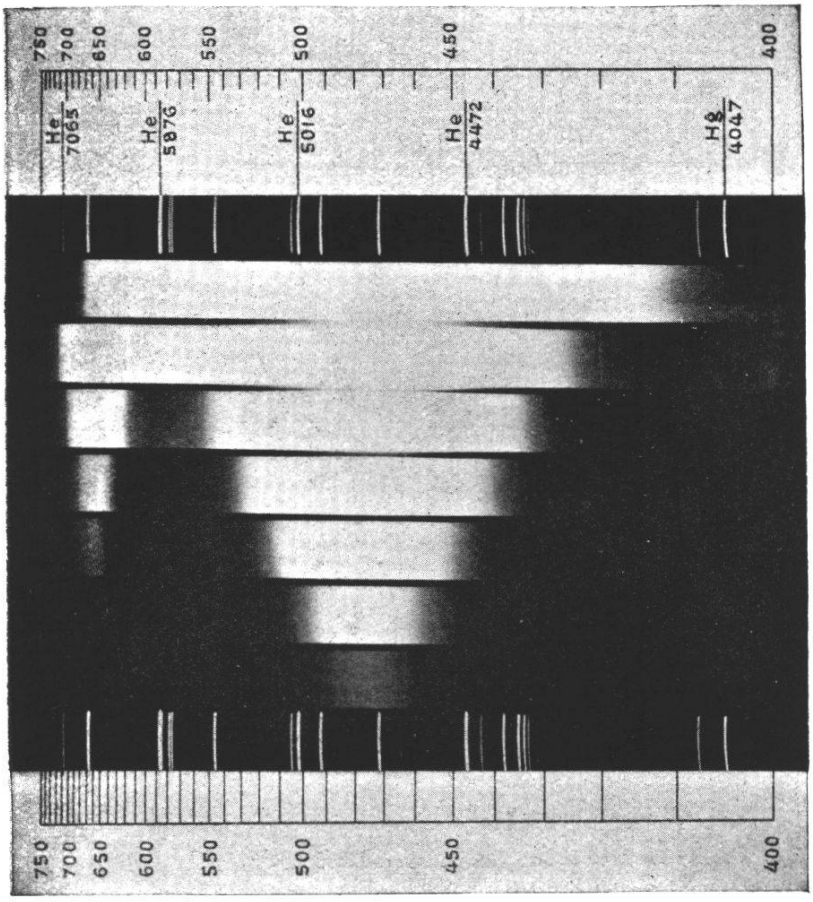

Fig. 10. — Sang de Seiche filtré.

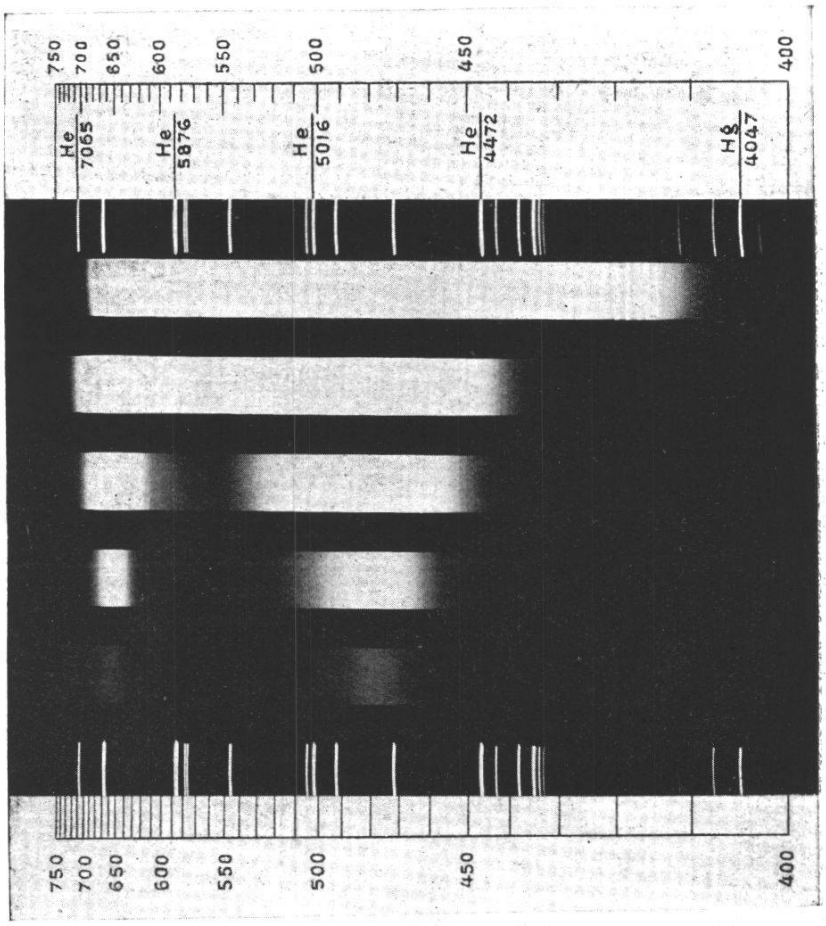

Fig. 11. — Sérum de Langouste filtré.

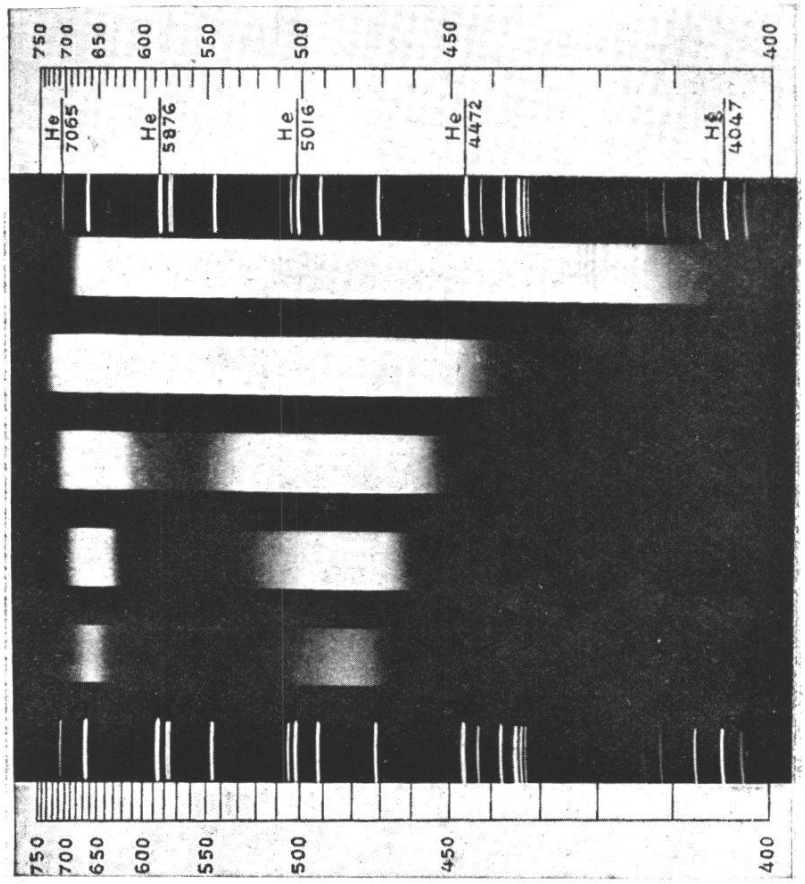

Fig. 12. — Oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée, dissoute en présence de $NaCl + CO^3Na^2$.

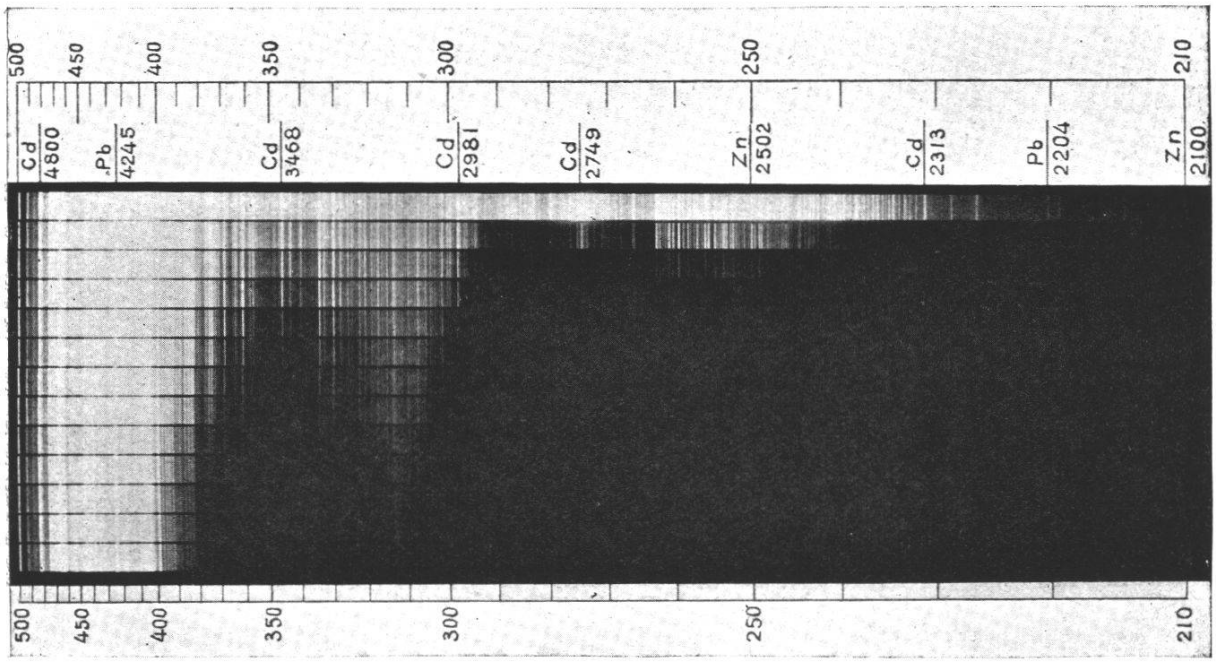

Fig. 13. — Sang de Seiche filtré.

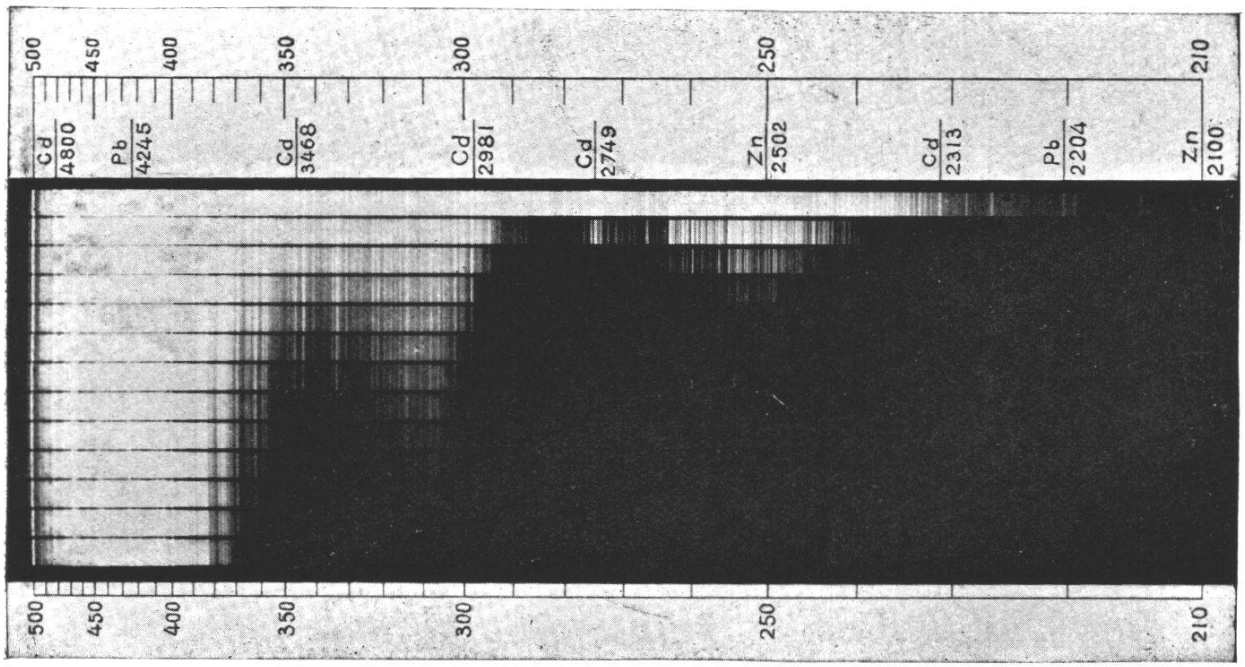

Fig. 14. — Oxyhémocyanine de Langouste (solution *neutre*).

BIBLIOGRAPHIE

Nous nous bornons à indiquer nos publications et celles de Dhéré dans lesquelles sont cités les travaux des autres auteurs.

1. Ch. Dhéré, Sur la préparation et sur quelques propriétés de l'oxyhémocyanine d'Escargot cristallisée. *C. R. Acad. des Sciences*, Paris, 1908 (1), p. 784.
2. Ch. Dhéré, Sur la diversité des hémocyanines suivant leur provenance zoologique. *C. R. Acad. des Sciences*, Paris, 1913 (2), p. 309.
3. Ch. Dhéré et A. Burdel, Sur l'absorption des rayons visibles par les oxyhémocyanines. *C. R. Acad. des Sciences*, Paris, 1913 (2), p. 552.
4. Ch. Dhéré et A. Burdel, Sur la cristallisation d'une oxyhémocyanine d'Arthropode. *C. R. Acad. des Sciences*, Paris, 1914 (1), p. 978.
5. Ch. Dhéré et A. Burdel, Nouvelles recherches sur la cristallisation de l'oxyhémocyanine d'Escargot. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914 (1), p. 559.
6. Ch. Dhéré, Recherches sur l'hémocyanine. — Premier Mémoire. — Teneur en cuivre et capacité respiratoire des sangs hémocyaniques. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1916, p. 985-997.
7. Ch. Dhéré, Recherches sur l'hémocyanine. — Deuxième Mémoire. — Teneur en cuivre et capacité respiratoire des sangs hémocyaniques (suite). *Ibid.*, 1919, p. 221-243.
8. Ch. Dhéré, Recherches sur l'hémocyanine. — Troisième mémoire. — Cristallisation de l'hémocyanine. *Ibid.*, 1919, p. 503-526.
9. Ch. Dhéré et A. Burdel, Recherches sur l'hémocyanine. — Quatrième Mémoire. — Spectre d'absorption visible de l'oxyhémocyanine. *Ibid.*, 1919, p. 685-701.
10. Ch. Dhéré, Recherches sur l'hémocyanine. — Cinquième Mémoire. — Spectre d'absorption ultraviolet de l'oxyhémocyanine. *Ibid.*, 1920, p. 1081-1093.
11. Ch. Dhéré et A. Schneider, Recherches sur l'hémocyanine. Sixième Mémoire. — Action de quelques gaz sur l'hémocyanine. *Ibid.*, 1922, p. 1-13.
12. Ch. Dhéré et A. Schneider. Recherches sur l'hémocyanine. Septième Mémoire. — Action de quelques gaz sur l'hémocyanine (suite). *Ibid.*, 1922, p. 34-40.