

## Note Relative a l'Action Photodynamique de l'Hématoporphyrine Sur Le Fibrinogène

W.-H. Howell

To cite this article: W.-H. Howell (1921) Note Relative a l'Action Photodynamique de l'Hématoporphyrine Sur Le Fibrinogène, Archives Internationales de Physiologie, 18:1, 269-276, DOI: [10.3109/13813452109144181](https://doi.org/10.3109/13813452109144181)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/13813452109144181>



Published online: 26 Sep 2008.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)

---

## NOTE RELATIVE A L'ACTION PHOTODYNAMIQUE DE L'HÉMATOPORPHYRINE SUR LE FIBRINOGENE,

(*School of Hygiene and Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, V. S. A.*)

PAR

W.-H. HOWELL.

---

LES effets photodynamiques de l'hématoporphyrine tels qu'ils furent décrits par HAUSMANN (1) sur les infusibles, les érythrocytes et les souris ont été confirmés par divers observateurs, mais jusqu'à présent une explication satisfaisante de cette réaction nous manque. L'action de l'hématoporphyrine sur les souris, action sensibilisante vis-à-vis de la lumière, est particulièrement difficile à comprendre dans l'état où nous la montre une synthèse des principaux faits observés. Une dose d'hématoporphyrine aussi faible que 2 mgr. injectée sous la peau d'une souris blanche, se montre fatale en peu d'heures si l'animal est exposé à une vive lumière, tandis que très souvent cette dose n'est pas nuisible si la souris est maintenue dans l'obscurité. Bien plus : un animal traité par l'hématoporphyrine, mais conservé à l'obscurité, peut montrer l'effet photodynamique s'il est exposé à la lumière à n'importe quel moment de la première quinzaine ou plus longtemps après l'injection, bien que toutes les traces décelables d'hématoporphyrine aient disparu de l'organisme.

Les symptômes que montrent les animaux ont été décrits en détail par HAUSMANN. Dans mes propres observations, limitées à ce que HAUSMANN appelle les cas aigus, l'animal montre d'abord une congestion des oreilles et des pattes ; cette congestion disparaît dans la suite. Puis surviennent un œdème très marqué autour du nez et de la bouche et une irritation cutanée de la région céphalique, démontrée par les mouvements de grattement de l'animal. Ces symptômes disparaissent plus tard en tout ou en partie, mais on voit persister la photophobie qui se manifeste par l'occlusion des yeux et par une préférence pour les zones ombragées de la cage occupée par les animaux. Parfois l'animal tombe dans un état léthargique, interrompu de temps à autre par des mouvements spasmodiques, et la respira-

tion se ralentit jusqu'à ce que la mort survienne. Pendant cette ultime période, il doit exister un degré marqué d'insensibilité, car on observa que, dans cet état, les souris ne réagirent par aucun trouble sensoriel évident lorsque des animaux de contrôle placés dans la même cage leur endommageaient les oreilles.

Dans mes expériences, chez quelques animaux injectés au moyen d'une préparation impure non cristallisée d'hématoporphyrine, j'ai observé au niveau des yeux l'apparition d'une cataracte. L'examen *post mortem* montra une opacité limitée à la couche toute superficielle du cristallin, dans la région équatoriale qui est en contact avec les procès ciliaires. Si nous songeons que dans ces expériences la lumière ne peut pénétrer d'une façon appréciable au delà du plexus sous-cutané des vaisseaux sanguins, nous devons admettre, pour expliquer les effets mortels, que des substances toxiques se forment probablement dans la peau elle-même (ainsi que JESIONEK (2) le pense), sous l'influence combinée de l'hématoporphyrine et de la lumière, et que ces substances exercent ensuite leur effet sur le système nerveux central, soit par la voie sanguine, soit encore par un phénomène réflexe.

Vu que les faits que nous connaissons jusqu'à présent sont insuffisants pour nous permettre une explication de cette curieuse réaction, il est utile d'étendre les expériences et de collectionner toutes les influences susceptibles d'agir sur le phénomène.

Le but principal de la présente note est d'attirer l'attention sur quelques observations nouvelles relatives à l'action photodynamique de l'hématoporphyrine sur le fibrinogène du sang. Le chlorhydrate d'hématoporphyrine cristallisé employé dans mes expériences fut préparé suivant la technique générale indiquée par MENCKI et SALESKI. Comme les indications qui ont été publiées sur cette méthode ne sont pas très explicites, je rappellerai brièvement le procédé dont je me suis servi :

On prépare de l'hémine d'après la méthode de MÖRNER (3). Cinq grammes d'hémine sont dissous dans 75 cc. d'acide acétique glacial préalablement saturé d'acide bromhydrique gazeux à 10° C. La solution est maintenue au repos pendant 3 ou 4 jours à la température ordinaire et est ensuite versée dans 600 cc. d'eau. Après repos de plusieurs heures, ce mélange est filtré et, au filtrat, on ajoute de l'hydroxyde de sodium à 10% jusqu'à formation d'un précipité abondant et décoloration presque complète de la solution. On filtre et on lave le précipité à l'eau jusqu'à ce que l'eau

de lavage ne donne plus de réaction avec le nitrate d'argent. Le précipité encore humide est digéré au bain-marie avec de l'hydroxyde de soude dilué à 2 %, dilué avec un égal volume d'eau et filtré. Le filtrat est précipité par l'acide acétique à 33 % que l'on ajoute jusqu'à obtention d'une réaction acide nette. Le précipité est séparé par centrifugation et lavé à l'eau par centrifugation jusqu'à ce que le précipité montre des signes de non-sédimentation. Le résidu humide, obtenu par décantation du liquide surnageant, est traité sur le bain d'eau par l'acide chlorhydrique dilué à 1 %, en évitant avec soin un excès d'acide. La solution est filtrée à chaud pour la séparer de l'abondant résidu gommeux, placée dans un cristalliseur, dans le vide, sur l'acide sulfurique et abandonnée jusqu'à évaporation à sec. Des cristaux se forment. Le résidu est bien lavé avec de l'acide chlorhydrique à 10 %, séché et redissous au bain-marie dans de l'acide chlorhydrique à 10 %, en évitant un excès d'acide. Cette solution est filtrée et le filtrat est additionné d'un dixième de son volume d'acide chlorhydrique concentré. La solution est placée dans le vide sur de l'acide sulfurique jusqu'à cristallisation. Les cristaux sont entraînés par aspiration, lavés avec de l'acide chlorhydrique à 1 %, précipités par addition d'acide chlorhydrique concentré et la solution est de nouveau abandonnée à la cristallisation dans le vide. Le second lot de cristaux, après lavage, est desséché et conservé dans un exsiccateur à l'obscurité.

Les solutions de fibrinogène que j'ai employées dans mes expériences furent préparées à partir du plasma oxalaté de chat, en suivant une modification de la méthode d'HAMMARSTEN, employée pendant un certain temps dans ce laboratoire et dans laquelle la précipitation se fait par le sulfate d'ammonium et non par le chlorure de sodium (4).

Le plasma est précipité par addition d'un volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à trois ou quatre volumes de plasma. Après centrifugation et lavage, le précipité est dissous dans une solution à 1 % de chlorure de sodium, filtré et reprécipité par addition d'un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium à quatre volumes de la solution de fibrinogène. Le précipité est séparé par centrifugation et dissous dans une solution de 1 % de chlorure de sodium, en utilisant la moitié ou les 3/4 du volume primitif de plasma,

En dissolvant le second précipité sans la solution alcaline, il peut être nécessaire d'ajouter quelques gouttes d'une solution de bicarbonate de soude à 1 %. Si on emploie le plasma de chat, deux précipitations suffisent à donner une bonne préparation de fibrinogène; avec le plasma de cheval, trois ou quatre précipitations sont indispensables.

Si, à une solution de fibrinogène préparée de cette façon, on ajoute de petites quantités d'hématoporphyrine et qu'on expose pendant une ou deux heures le mélange à la lumière solaire, ou pendant un temps un peu plus long à une lampe au tungstène (à courte distance), on constatera que le fibrinogène a perdu complètement la propriété de coaguler par la thrombine et a également perdu celle de donner un précipité par la chaleur. Le *modus operandi* de ces expériences fut le suivant :

L'hématoporphyrine fut préparée en solution à 0.2 %, dont 1 à 3 gouttes furent ajoutées à 5 cc. de la solution de fibrinogène. Ce mélange, contenu dans un étroit tube à essai, était placé dans un gobelet d'eau froide et exposé dans la chambre à la lumière directe du soleil. L'eau du gobelet était renouvelée de temps en temps, de façon à maintenir sa température à un niveau égal ou inférieur à 20° C. Dans le même gobelet était placée une solution témoin de fibrinogène sans hématoporphyrine. Une seconde solution témoin de fibrinogène et d'hématoporphyrine était conservée à l'obscurité. Après un temps donné les trois échantillons étaient soumis à la réaction à la chaleur et à la thrombine. Dans le but d'exécuter cette seconde réaction, j'utilisai des échantillons de thrombine sèche, préparée par une méthode décrite antérieurement (5). La thrombine sèche peut être conservée indéfiniment dans un exsiccateur et est facilement soluble dans l'eau ou dans une solution saline diluée.

Des expériences exécutées de cette façon montrèrent que pour les durées indiquées d'exposition à la lumière les solutions de fibrinogène ne sont en rien affectées par la lumière. Elles donnent un caillot gélatineux typique en 3 à 5 minutes avec la solution de thrombine, et le précipité habituel si on les chauffe à 54°-56° C. L'échantillon de fibrinogène et d'hématoporphyrine conservé dans l'obscurité n'est pas modifié non plus après 24 heures ou plus. Il coagule par la thrombine, même plus rapidement que le fibrinogène seul, et est précipité par chauffage à 54°-56° C. Au contraire, l'échantillon de fibrinogène et d'hématoporphyrine exposé à la lumière ne donne aucun caillot avec la thrombine et ne précipite pas par la chaleur entre 60° et 90° C. On peut constater que l'éosine donne des réactions similaires : on utilise une solution d'éosine à 1/1000, dont deux gouttes sont ajoutées à 5 cc. de la solution de fibrinogène.

Si l'exposition à la lumière est raccourcie, des résultats intermédiaires peuvent être obtenus. Ceci signifie que le fibrinogène peut don-

ner un caillot avec la thrombine, mais le temps de coagulation est plus ou moins allongé, ou bien la solution se coagule imparfaitement au lieu de se prendre en une gelée compacte.

Outre ses réactions à la thrombine et à la chaleur, le fibrinogène perd dans ces conditions sa propriété de précipiter par dialyse.

Dans ces expériences, des sacs de collodion fraîchement préparés furent utilisés et l'échantillon de fibrinogène et d'hématoporphyrine qui avait été exposé à la lumière, ainsi qu'un échantillon de fibrinogène seul également illuminé, furent dialysés en présence d'un grand volume d'eau distillée. La solution témoin donna à bref délai un abondant précipité, tandis que la solution à l'hématoporphyrine ne donna ni opalescence ni précipité après une dialyse de nombreuses heures. D'autre part, on constata qu'une solution de fibrinogène et d'hématoporphyrine fut, après exposition à la lumière, précipitée rapidement comme une solution normale de fibrinogène, par addition d'acide acétique dilué ou par une solution saturée de sulfate d'ammonium, ajoutée dans la proportion d'un volume pour quatre ou cinq volumes de la solution.

J'exécutai des expériences du même genre avec de la pseudoglobuline extraite du même plasma, après élimination du fibrinogène qui fut précipité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. La pseudoglobuline fut purifiée par reprécipitation et fut alors, après addition d'hématoporphyrine, exposée à la grande lumière du soleil pendant de nombreuses heures. Même après une exposition prolongée, on constata que la pseudoglobuline ne fut pas altérée en ce qui regarde sa température de coagulation par la chaleur.

L'action photodynamique de l'hématoporphyrine sur le fibrinogène s'exerce plus rapidement quand ce dernier a été purifié par plusieurs précipitations. S'il n'est précipité qu'une fois par le sulfate ammonique, il faut à la lumière un temps plus long pour produire l'effet décrit. Il paraît probable que, dans ce cas comme dans celui de l'action photodynamique de l'éosine sur les érythrocytes, les autres protéines présentes exercent une action protectrice. C'est un fait bien connu que le sérum et de nombreuses protéines protègent les érythrocytes contre l'hémolyse par l'éosine quand elles sont exposées à la lumière. SCHMIDT et NORMAN (6) ont montré que cette action protectrice appartient aussi à quelques amino-acides (tryptophane et tyrosine) et ils pensent que la protection conférée par les protéines est due à la présence de ces amino-acides dans la molécule.

En accord avec cette constatation générale, on trouve que le fibrinogène en plasma oxalaté est moins facilement altéré qu'après précipitation et séparation des autres protéines du plasma. Au cours des observations faites sur le plasma oxalaté, les effets de l'hématoporphyrine et de la lumière furent éprouvés de trois manières : par la chaleur à 56°-60°, par l'action coagulante de la thrombine et par la coagulation causée par recalcification de la solution. En employant du plasma oxalaté de chat additionné d'hématoporphyrine, on trouve qu'une exposition de 4 heures à la grande lumière du soleil est en général suffisante pour empêcher la précipitation du fibrinogène par la chaleur à 60° C. et pour détruire sa propriété de coaguler par addition d'une solution de thrombine. Mais la coagulation causée par recalcification du plasma fut affectée plus lentement et incomplètement. Pour une exposition suffisante, le temps de coagulation par ce procédé fut prolongé depuis 5 à 6 minutes (temps normal montré par le plasma neuf ou le plasma à l'hématoporphyrine conservé à l'obscurité) jusqu'à 45 à 100 minutes. Il est intéressant de noter que SELLARDS a antérieurement publié que des échantillons de plasma oxalaté contenant de la bilirubine ne coagulent pas à la lumière après addition de sérum, bien qu'ils coagulent rapidement après recalcification.

Quelques expériences imparfaites furent entreprises pour déterminer à quelle longueur d'onde la lumière exerce son action photodynamique maximale sur les solutions de fibrinogène et d'hématoporphyrine. Dans une première série, les solutions furent tamisées avec des filtres variés : un filtre rouge laissant passer des longueurs d'onde de 5800 à 6800, un filtre vert laissant passer des longueurs comprises entre 4870 et 5700 et un filtre bleu laissant passer la lumière entre 4950 et 3520. L'effet sur le fibrinogène fut plus rapide sous le filtre vert et moins rapide sous le bleu. Après exposition prolongée, cependant, le fibrinogène montra l'effet habituel dans les trois cas. Dans ces expériences, les tubes contenant le fibrinogène et l'hématoporphyrine furent disposés dans la chambre obscure de telle façon que seule la lumière ayant traversé les filtres pouvait les atteindre. Dans une seconde série, une grille concave de ROWLAND à la longueur focale de 1 mètre ainsi que la lumière d'un arc au fer-carbone furent utilisés. Vu la faible intensité de la lumière, l'action de l'hématoporphyrine sur les érythrocytes fut expérimentée de préférence à son action sur le fibrinogène. Des tubes conte-

nant une suspension à 0.2 % de globules lavés, additionnés chacun de quelques gouttes d'une solution d'hématoporphyrine de 0.2 %, furent exposés au spectre, aux longueurs d'onde de 2400, 3000, 4000, 5000, et au rouge foncé pendant une heure et demie. On utilisa des tubes de quartz pour les échantillons à 2400 et 3000. Pour les temps d'exposition employés, l'hémolyse ne se produisit dans aucun des tubes, mais quand ils furent ultérieurement placés à la lumière solaire l'hémolyse apparut plus rapidement dans le tube préalablement exposé à 5000 et ensuite dans celui préalablement exposé au rouge foncé. Telles qu'elles sont, ces expériences tendent à confirmer les faits observés par HAUSMANN, c'est-à-dire que l'action photodynamique maximale de l'hématoporphyrine se produit avec des longueurs d'onde voisines de 5000, qui correspondent à leur principale bande d'absorption.

A ce propos, j'ai observé une intéressante différence entre l'action des rayons ultraviolets « *rapprochés* » ou « *éloignés* », le dernier terme s'appliquant à des rayons à longueur d'onde inférieure à 3000. La lumière ultraviolette rapprochée fut obtenue en faisant passer la lumière d'un arc à vapeur de mercure à travers du verre ultraviolet de Wood, qui a une longueur de transmission intermédiaire entre 3900 et 3300. Une telle lumière est sans effet (pour le temps d'exposition utilisé) sur des solutions de fibrinogène seul, mais sur les solutions qui contiennent de l'hématoporphyrine le fibrinogène, après une exposition de 1 à 2 heures, montre les effets décrits ci-dessus, notamment une perte complète de la propriété de précipiter par la chaleur ou de coaguler par la thrombine. Les effets des rayons ultraviolets éloignés furent obtenus en exposant dans des tubes de quartz les solutions à la lumière non tamisée d'un arc à vapeur de mercure. Cette lumière cause la précipitation des solutions de fibrinogène après une exposition de 1/2 à 3/4 heure, et ceci s'accorde avec son action coagulante bien connue sur des solutions de protéine. Quand de l'hématoporphyrine était ajoutée à la solution de fibrinogène, cette précipitation ne se produisait pas. La solution restait claire, mais elle ne donnait plus de caillots avec la thrombine.

Plusieurs auteurs ont supposé que l'action sensibilisante de l'hématoporphyrine et d'autres réactifs photodynamiques consiste essentiellement dans une altération de la substance considérée, telle qu'elle rend les longues ondes lumineuses capables d'effectuer les changements que l'on sait être causés par les courts rayons ultraviolets.



SCHANZ (8) a établi que la lumière agit sur les solutions de protéines en les rendant moins solubles, ainsi que l'indique la plus grande facilité de précipitation, et que cet effet est facilité par l'éosine, l'hématoporphyrine et d'autres sensibilisateurs. Cette conclusion n'est évidemment pas applicable au cas du fibrinogène.

Tandis que les rayons ultraviolets éloignés causent la précipitation du fibrinogène, cette réaction est empêchée par la présence de l'hématoporphyrine. *L'effet de ce sensibilisateur est de rendre les lumières visible et ultraviolette capables de changer le fibrinogène en une forme plus soluble de protéine. Le fibrinogène, insoluble dans l'eau, est changé en une protéine soluble dans l'eau, protéine non précipitée par la chaleur et non coagulée de ses solutions par l'action de la thrombine. Cette modification est analogue à celle que produit l'action des alcalis.*

La façon dont l'hématoporphyrine participe à la réaction n'a pas encore été découverte. On sait parfaitement que pour que la réaction photodynamique se produise, l'hématoporphyrine et la substance sur laquelle elle agit doivent être en contact intime l'une avec l'autre pendant que la lumière agit. Une exposition préalable de l'hématoporphyrine à la lumière ne détermine pas de changement capable d'affecter le fibrinogène quand les solutions sont ultérieurement mises en contact dans l'obscurité, et une solution d'hématoporphyrine séparée par une mince lame de quartz d'une solution de fibrinogène n'exerce aucune action photodynamique si on l'expose à la lumière. Il semblerait que l'hématoporphyrine déclanche ou facilite l'action de la lumière à la façon d'un catalyseur.

#### BIBLIOGRAPHIE.

1. HAUSMANN. *Biochemische Zeitschrift*, vol. XXX, p. 276, 1911.
2. JESIONEK. *Ergebnisse der inneren Medizin u. Kinderheilkunde*, vol. XI, p. 525, 1913.
3. KUSTER. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, vol. XXIX, p. 185, 1900.
4. MC LEAN. *The Johns Hopkins Hospital Bulletin*, vol. XXXI, p. 453, Dec. 1920.
5. HOWELL. *The Harvey Lectures*, Series XII, p. 272, 1916 and 1917.
6. SCHMIDT and NORMAN. *Journal of Infectious Diseases*, vol. XXVII, p. 40, 1920.
7. SELLARDS. *The Journal of Medical Research*, vol. XXXVIII, p. 293, 1918.
8. SCHANZ. *Pflüger's Archiv f. d. ges. Physiologie*, vol. CLXX, p. 646, 1918.