

ORIGINALS

Quelques aspects du métabolisme du zinc chez le diabétique

W. DETTWYLER*

Department of Experimental Medicine, Prof. W. J. H. BUTTERFIELD, O. B. E., M. D. JOHNS HOPKINS, F. R. C. P.,
Guy's Hospital, London S. E. 1

Reçu le 6 janvier, 1966

Some aspects of zinc metabolism in diabetics.

Summary. Gel filtration offers new possibilities for studying labelled zinc fixation on plasma proteins. This heavy metal has a great affinity to protein, but its binding is reversible under the effect of pH and chelating substances (Versenate, Penicillamine). — The existence of endogenous chelating substances as well as the chelating effect of Alloxan are not confirmed. — Owing to an appropriate dose of Versenate, it is possible to obtain a chelating effect of 50% of labelled zinc, which defines a zinc fixation index on plasma proteins. Comparing plasma of normal and diabetic subjects decompensated and not yet treated, it is possible to show evidence of a higher fixation in diabetics. This higher fixation capacity is probably the result of an increase in globulin fractions fixing zinc strongly, but it is not possible to assess whether it is a primary or a secondary phenomenon to diabetes. — It is known that proteinuria appears very early, even contemporary to the onset of diabetes and its importance seems quite sufficient to explain zincuria which is increased in diabetics badly decompensated.

Résumé. La filtration sur gel de dextran offre de nouvelles possibilités d'étudier la fixation du zinc marqué sur les protéines plasmatiques. Ce métal lourd a une très grande affinité pour les protéines, mais sa liaison est réversible sous l'effet du pH acide ou des chélateurs (Versenate ou Pénicillamine). — L'existence de chélateurs endogènes ainsi qu'un effet chélateur de l'Alloxane peuvent être infirmés. — Grâce à une dose appropriée de Versenate, il est possible d'obtenir in vitro une chélation de 50% de zinc marqué, définissant ainsi un index 2 de fixation du zinc sur les protéines plasmatiques. En comparant le plasma de sujets normaux et de sujets diabétiques décompensés et non encore traités, il est possible de mettre en évidence un pouvoir de fixation plus élevé chez

les diabétiques. — Cette capacité de fixation plus élevée paraît être liée à une augmentation des fractions protéiques (globulines) qui fixent le zinc fortement, sans qu'il soit possible de dire si elle est un phénomène primaire ou secondaire au diabète. — On sait que la protéinurie est très précoce, même contemporaine de l'apparition d'un diabète et son importance paraît suffisante pour expliquer la zincurie augmentée chez les diabétiques gravement décompensés.

Einige Aspekte des Zinkstoffwechsels beim Diabetiker.

Zusammenfassung. Die Filtration über Dextran-Gel eröffnet neue Möglichkeiten, um die Bindung von markiertem Zink an die Plasmaproteine zu erforschen. Dieses Schwermetall hat eine große Affinität zu Proteinen, seine Bindung daran ist jedoch unter dem Einfluß von saurem P_H und Chelatbildnern wie Titriplex und Penicillamin reversibel. Die Theorien über die Existenz endogener Chelatbildner ebenso wie die über chelatbildende Wirkungen des Alloxans sind nicht mehr aufrechtzuerhalten. — Mit einer geeigneten Dosis von Titriplex läßt sich in vitro eine Chelatbildung mit 50% des markierten Zinks erreichen und damit ein Index für das Fixationsvermögen von Zink an Plasma-eiweißkörper gewinnen. Beim Vergleich der Plasmen von Kontrollpersonen und von unbehandelten, dekompensierten Diabetikern ließ sich bei den Diabetikern ein erhöhtes Bindungsvermögen nachweisen. — Dieses erhöhte Bindungsvermögen scheint uns durch eine Vermehrung der Serumeiweißanteile mit einer ausgeprägten Bindungskapazität für Zink (Globuline) bedingt zu sein, ohne daß man sagen kann, ob es sich dabei um ein primäres oder sekundäres Phänomen beim Diabetes handelt. — Es ist bekannt, daß die Proteinurie sehr frühzeitig, ja oft schon bei der Manifestation des Diabetes auftritt, und ihr Ausmaß scheint uns zu genügen, um die vermehrte Zinkausscheidung beim schwer dekompensierten Diabetiker zu erklären.

Introduction

Depuis une dizaine d'années, les travaux concernant le métabolisme du zinc se sont multipliés: les uns tentent de préciser son état dans l'organisme et en particulier sa liaison chimique sur les protéines plasmatiques, les autres de comprendre sa fonction biologique. Métal lourd et oligoélément, il se distribue très inégalement dans l'organisme. Dans le sang le 85% se trouve dans les érythrocytes qui représentent une forme de transport; le reste se répartit sur les protéines plasmatiques

et certains enzymes où sa présence est indispensable. Le taux plasmatique du zinc est de 100 à 120 µg par 100 ml [32, 30, 33].

Son mode de fixation n'est pas entièrement connu. Sur l'albumine humaine [12] le zinc se fixe sur le groupe imidazole de l'histidine, mais la solubilité en est modifiée. Sur les γ-globulines la position du zinc n'est pas précisée, mais le complexe que forme le zinc avec elles est plus instable que celui qu'il forme avec l'albumine: c'est la base du fractionnement des protéines développé par COHN [5]. Dans un domaine plus pratique, l'étude de l'interaction du zinc et de l'insuline a abouti à la production d'insulines lentes qui sont vraisemblablement des complexes ou des polymères insolubles [27, 13, 33]. Leur structure chimique a été précisée et on

* Nos remerciements vont au Dr. G. CONSTAM, médecin-adjoint à la Policlinique de Médecine de Zürich, pour les critiques constructives qu'il nous a faites et à Mademoiselle MYRA LEE dont l'assistance technique et la collaboration nous ont été très précieuses.

sait que l'atome de zinc se fixe, comme dans le cas de l'albumine, sur le groupe imidazole de l'histidine [8]. Les substances comme le BAL ou le Versenate, qui sont des chélateurs des ions métalliques bivalents, peuvent chez certains diabétiques, augmenter la sensibilité à l'insuline [3, 4] en éliminant le zinc du complexe insuline, permettant ainsi son action immédiate.

L'état et le mode de fixation du zinc sur les protéines plasmatiques a été l'objet de plusieurs travaux dont la diversité des méthodes rend la comparaison difficile. VIKBLADH [32] combinant la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium et l'extraction du zinc par la dithizone arrive à mettre en évidence qu'une fraction du zinc seulement est extractible, faiblement liée aux protéines. Cet auteur conclut que le 50% du zinc est faiblement lié à l'albumine, le 24% est faiblement lié aux globulines et le 26% est fortement lié à ces mêmes globulines. Le zinc fixé sur les enzymes ne représente qu'une faible partie du zinc fortement lié. L'analyse par dialyse équilibrée montre une prépondérance du zinc fortement lié sur la fraction α -globulinique [9]. L'analyse électrophorétique confirme ces résultats [35], alors que l'analyse par ultracentrifugation met en évidence une répartition régulière et proportionnelle du zinc faiblement lié sur l'ensemble des protéines [21].

Il n'y a pas de protéines spécifiquement responsables de la fixation et du transport du zinc, comme la sidérophiline l'est pour le fer ou la céruloplasmine pour le cuivre. Des variations pathologiques n'ont guère d'importance en clinique. Le taux sérique du zinc diminue dans la cirrhose éthylique, les syndromes néphrotiques et les anémies marquées et n'est que rarement augmenté dans l'hyperthyroïdie et la polycythémie. Dans le diabète, CONSTAM [7] trouve un taux plasmatique de zinc un peu plus élevé que chez les sujets normaux. L'augmentation est parallèle à la gravité, à la durée d'évolution de la maladie et au traitement par l'insuline. Mais d'autres auteurs infirment ces résultats [28, 34, 24]. Son élimination urinaire est augmentée dans la cirrhose et les syndromes néphrotiques [29] de même que dans le diabète en état de décompensation [6, 7]; de plus Dithizone et Alloxane, en produisant un diabète expérimental, augmentent également la zincurie [17].

L'introduction récente de la filtration sur gel de dextran offre une possibilité nouvelle d'étudier l'état du zinc plasmatique, l'affinité des protéines plasmatiques pour cet ion et la présence d'éventuels chélateurs endogènes.

Méthode

La filtration sur gel de dextran (Sephadex) permet une séparation efficace entre la fraction liée aux protéines et la fraction libre des ions métalliques existant dans le plasma ou dans un mélange. La méthode originale a été décrite en 1957 [23] et FLODIN en précise les bases physico-chimiques et la technique en 1962 [11].

Tous les détails techniques et pratiques du montage de l'expérience ont été tirés de ces deux ouvrages.

Les échantillons à tester sont traités de la façon suivante: 1 ml de plasma, d'albumine ou de substance à étudier est additionné de zinc-65 (activité spécifique: 100 mC/g. Zinc) sous forme de chlorure, à la dose de 1 μ g, soit $1.5 \cdot 10^8$ M par ml de plasma et dilué à 2.2 ml par un tampon Michaelis II au pH voulu. Un temps d'incubation de une heure et de 24 h. suivant les cas a été choisi [9, 21]. Les résultats sont exprimés en ml d'éluat comptés à partir du moment où l'échantillon à tester est placé dans la zone supérieure du gel. La radioactivité de chaque fraction de 2.2 ml d'éluat est exprimée en % de la radioactivité retrouvée dans les 30 premières fractions éluées: en 66 ml, la totalité de l'iode et le 93% du zinc sont récupérés.

Les constantes de diffusion des 3 groupes de substance servant de base à ce travail (à savoir les protéines, le Versenate ou la Pénicillamine et les ions zinc ou iode) sont suffisamment différentes pour qu'une bonne séparation soit possible. La fig. 1 montre le pouvoir de séparation du Sephadex-G-25 pour ces groupes de substances étudiés séparément. Il est donc possible d'identifier 3 zones.

La première: zone initiale, correspondant au volume exclu, est caractérisée par la présence des protéines (de la 8^{ème} à la 12^{ème} fraction collectée).

La deuxième: zone intermédiaire, correspondant à une diffusion partielle dans le gel est caractérisée par la présence de la pénicillamine et du Versenate, de l'insuline commerciale et de l'insuline humaine (de la 13^{ème} à la 17^{ème} fraction collectée).

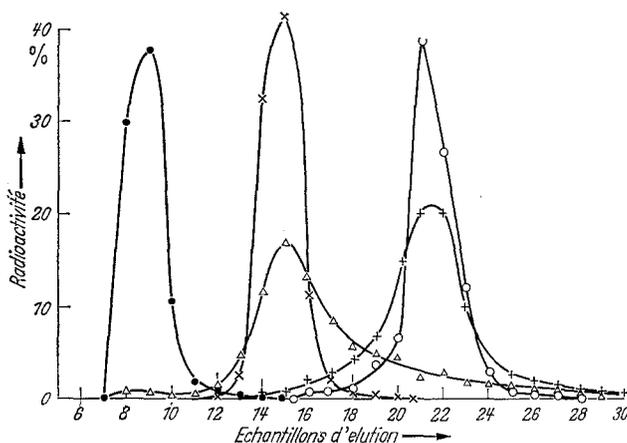


Fig. 1. Pouvoir de séparation du Sephadex G-25
Zone 1.: Protéines ●—●. Zone 2.: Versenate et Pénicillamine ×—×;
Insuline ——. Zone 3.: Zinc +—+; Iode ○—○
Chaque échantillon d'élution correspond à 2,2 ml

La troisième: zone finale, correspondant à une diffusion complète dans le gel, est caractérisée par la présence des ions zinc ou iode. L'iode apparaît en un pic haut et étroit, le zinc forme un dôme plus étalé que la théorie ne le prévoit.

Résultats

La totalité du zinc ajouté, à la dose physiologique de $1 \mu\text{g}$ par ml de plasma, se fixe très rapidement sur les protéines et apparaît avec elles dans leur zone d'éluion. Il n'y a pas de fraction restée libre et il n'y a pas de taux de saturation au-delà duquel apparaîtrait une fraction libre. La fig. 2 montre que les protéines sont capables de fixer jusqu'à 100 fois le taux plasmatique normal du zinc; au delà la fixation est limitée par une précipitation croissante. Le zinc se comporte donc différemment du calcium [31] ou du fer [2].

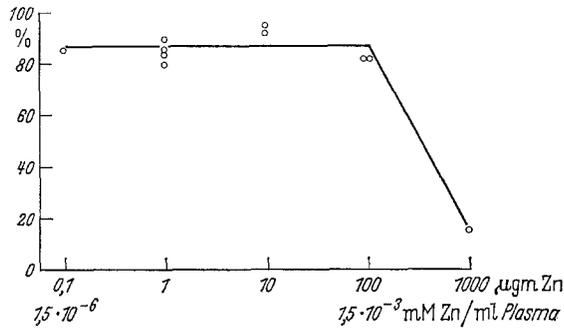


Fig. 2. Courbe de saturation du zinc sur les protéines plasmatiques. En abscisse: dose de zinc. En ordonnée: % de zinc lié aux protéines. A $1,5 \cdot 10^{-2}$ mM Zn/ml de plasma, il se produit une floculation des protéines

Les ions zinc peuvent être dissociés de leur liaison aux protéines par des modifications du pH vers l'acidité (Fig. 3). A pH 5, la dissociation du zinc est totale, à pH 7 sa fixation sur les protéines est complète.

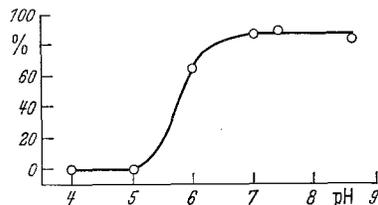


Fig. 3. Courbe de dissociation. En abscisse: pH. En ordonnée: % de Zn lié aux protéines

La fraction «libre» déplacée par l'acidité est éluée plus précocément que l'ion zinc isolé: ce qui laisse supposer qu'il s'agit de zinc lié à des fragments protéiques de petites tailles.

Il est possible d'obtenir une chélation du zinc fixé par les protéines au moyen du Versenate ou de la Pénicillamine et de construire une courbe de chélation (Fig. 4). Le Versenate a, à dose égale, un pouvoir chélateur plus puissant que la Pénicillamine, puisqu'une dose de Versenate de $0,1 \text{ mg}$ par ml de plasma produit une chélation de 95%, alors que la Pénicillamine à cette dose n'a encore aucun effet chélateur. La fig. 5 montre un exemple précis où la dose de Versenate

choisi permet une chélation de 50% environ. Notons que l'Alloxane à une dose plus élevée que la dose diabétogène n'a aucun effet chélateur dans le système utilisé.

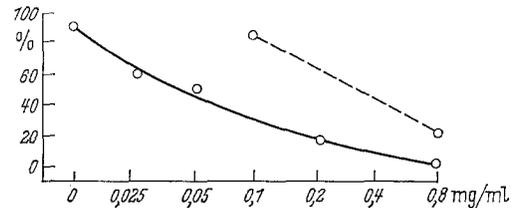


Fig. 4. Courbe de chélation. En abscisse: chélateur en mg par ml de plasma. En ordonnée: % de Zn lié aux protéines. Versenate —; Pénicillamine -----

8 plasmas de sujets jeunes et normaux, 1 cirrhotique avec ascite et dysprotéinémie, 1 diabète équilibré à l'insuline, 1 diabète équilibré par le régime et 10 diabètes récemment découverts, en état de décompensation grave et non encore traités, ont été étudiés. Tous ces plasmas fixent le zinc marqué à 100%, même lorsque la dysprotéinémie est importante comme chez le sujet cirrhotique. Pour révéler une différence entre ces plasmas nous avons choisi, parmi les moyens de libérer l'ion zinc de sa liaison aux protéines plasmatiques, l'effet d'un chélateur (Versenate de Ca) plutôt que la variation du pH. Sur la courbe de dissociation par le Versenate (Fig. 4), il est facile de choisir la dose permettant une chélation de 50% environ chez les sujets normaux et de définir ainsi un index de fixation des protéines plasmatiques du sujet normal. Pratiquement un temps d'incubation de 12 heures du zinc sur le plasma, puis de 1 heure du Versenate, se sont révélés utiles, pratiques et donnent les résultats les plus significatifs. La fig. 5 donne l'exemple précis

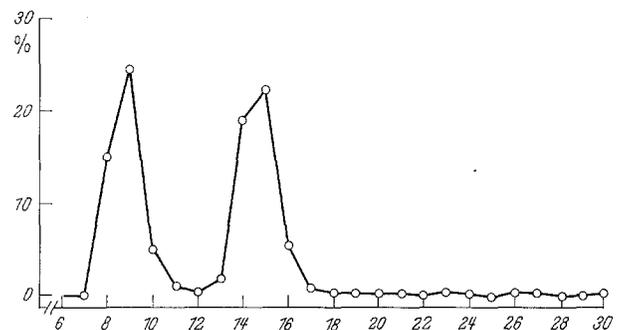


Fig. 5. Exemple particulier d'une courbe de dissociation par le versenate. Essai no 44. Plasma normal: D.B. Zinc marqué: $1 \mu\text{gm}$. Incubation 12 h. Versenate: $0,05 \text{ mg}$; Incubation: 1 h. Zinc lié aux protéines: 47,2%. Zinc lié au versenate: 49,7%

de la courbe obtenue avec un plasma normal soumis à l'incubation successive du zinc marqué et du Versenate. L'artifice de la chélation par adjonction de Versenate in vitro et la définition d'un index de fixation du zinc représentent donc une possibilité de tester

l'affinité des protéines pour le zinc. Tiré d'une première série d'expériences, le tableau I expose les résultats obtenus avec une dose de 0.05 mg de Versenate par ml de plasma, alors que le tableau II, dans une 2^{ème}

l'hyperglycémie. Le plasma du sujet cirrhotique se comporte également différemment des normaux: à l'inverse des diabètes décompensés, le pouvoir de fixation du zinc lié aux protéines est plus faible.

Tableau I. *Index de fixation du zinc sur les protéines plasmatiques. Versenate à la dose de 0.05 mg par ml de plasma*

		% de zinc marqué fixé aux protéines au Versenate		glycémie mg %	acétone	insuline uu/ml
Diabétiques décompensés	1. S.P.	57.1	39.5	690	+++	—
	3. T.S.	51.2	44.8	442	0	60
	4. T.A.	53.8	39.7	327	+	80
	7. H.M.	47.8	44.6	369	++++	52
	12. S.E.	56.1	38.9	320	+	—
	16. D.R.	53.1	42.5	412	++	43
Sujets normaux à jeun	D.B.	47.2	49.7	83	0	21
	M.L.	45.8	50.9	97	0	25
	E.C.	48.6	48.1	91	0	28
	V.D.	44.9	49.9	90	0	26
1 h. p. gluc.	V.D.	46.6	51.5	141	0	—
Cirrrose avancée	P.A.	23.3	74.5	137	0	126

Tableau II. *Index de fixation du zinc sur les protéines plasmatiques. Versenate à la dose de 0.025 mg par ml de plasma*

	Plasma	% de zinc marqué fixé aux protéines au Versenate		glycémie mg %	acétone	insuline uu/ml
Diabétiques décompensés	4. T.A.	73.8	23.3	327	+	80
	5. J.E.	72.6	20.5	400	0	57
	5. J.E.	68.8	27.8	400	0	57
	8. C.A.	72.5	24.0	258	?	58
	9. J.A.	72.0	24.1	192	0	79
	9. J.A.	72.9	26.3	192	0	79
Diabétique équilibré à l'insuline	10. M.A.	70.1	26.9	359	+++	—
	M.S.	65.2	34.6	141	0	—
Diabétique équilibré par régime	F.J.	61.0	38.1	127	0	—
sujets normaux	D.B. 4.7.	58.5	38.3	89	0	21
	D.B. 23.3.	62.2	33.6	95	0	25
	H.N.	62.4	34.2	91	0	31

série d'expériences, est basé sur une dose plus faible de 0.025 mg. Les plasmas des diabétiques décompensés se comportent différemment des normaux: la fraction libérée par le Versenate est plus faible, ou ce qui revient au même, le zinc est plus fortement fixé sur les protéines que chez les sujets normaux. Il n'y a aucun rapport avec l'importance de l'acidocétose ou de

On devait se demander quel rôle physico-chimique jouait la glycémie et pour cela de fortes doses de glucose: 5 mg et 10 mg par ml ont été ajoutés à 2 plasmas normaux: le pouvoir de fixation du zinc sous Versenate n'en a pas été modifié. De plus un plasma testé à jeun et une heure après 100 g de glucose per os s'est comporté de la même manière.

Discussion

La méthode de filtration sur gel de dextran offre une possibilité nouvelle d'investigation du comportement des ions métalliques dans le plasma. Il est confirmé que le zinc n'existe pas sous forme libre, même à des taux élevés et non physiologiques. Il se comporte ainsi de façon très différente du Ca [31] ou du Fe [2] qui présentent tous les deux une phase libre. La liaison du zinc marqué aux protéines est entièrement réversible, à la fois sous l'effet du pH et des chélateurs: cette réversibilité est tout à fait compatible avec la nature ionique de la liaison du zinc sur les protéines [19, 25]. Rappelons que les groupes imidazole qui le fixent ne sont de loin pas saturés à la dose physiologique ajoutée, puisqu'il n'y a qu'un atome de zinc pour 50 molécules de protéines environ.

A la lumière de ces résultats on pouvait s'attendre à une fixation identique du zinc sur les protéines plasmatiques des normaux et des diabétiques. Même une dysprotéïnémie très importante n'entraînera pas de différence dans la fixation de la petite dose physiologique de zinc. Il y a toujours assez de groupes imidazoles libres, même dans les hypoprotéïnémies marquées comme celle de notre patient cirrhotique. Ce comportement identique des plasmas normaux et diabétiques infirme également l'hypothèse de l'existence de chélateurs endogènes ou de substances apparentées chez les diabétiques. De plus l'Alloxane n'a aucun effet chélateur dans le système de filtration sur gel de dextran: son effet diabétogène que MASKÉ [17] attribue à une chélation du zinc ne semble donc pas s'expliquer par ce mécanisme.

Il en va tout autrement lorsqu'on étudie l'affinité des protéines pour le zinc par l'effet d'une dose appropriée d'un chélateur: Les plasmas des diabétiques décompensés se comportent alors de façon différente des normaux: ils ont une affinité plus grande pour le zinc radioactif et le fixent plus fortement. La cause de cette affinité augmentée n'est pas encore claire: nous pensons qu'elle est étroitement liée à la dysprotéïnémie, puisque ni la glycémie ni le degré d'acidocétose, ne paraissent l'influencer. Plusieurs auteurs sont arrivés à démontrer l'existence de 3 fractions de zinc plasmatiques: l'une faiblement liée sur l'albumine (50%), une autre faiblement liée aux globulines (24%) et une 3^{ème} fortement liée aux globulines (26%) [32], plus particulièrement sur les α - et les β -globulines [9, 15]. Au cours des différentes étapes du diabète, l'existence de variations du taux de certaines fractions globuliniques est connue et est liée en même temps au problème des inhibiteurs de l'insuline. L'augmentation de ces globulines pourrait s'accompagner d'une augmentation parallèle de la fraction du zinc fortement liée, démontrée de façon indirecte par une augmentation de l'affinité pour le zinc marqué sous l'artifice de la chélation. L'observation par CONSTAM [7] d'une zincémie augmentée dans le diabète appuie cette hypothèse. Enfin l'affinité diminuée du zinc pour les protéines plasmatiques du sujet cirrhotique peut s'expliquer également par la

dysprotéïnémie: ici c'est l'hypoalbuminémie qui joue le rôle majeur: l'albumine fixant le 50% du zinc faiblement lié [32]. La comparaison de l'affinité du zinc avec les résultats des électrophorèses que nous avons pratiquées ne permet pas d'aller plus loin. Une étude ultérieure, avec un gel plus fin permettant de tester les protéines plasmatiques séparées, pourrait préciser le rôle de la dysprotéïnémie.

L'augmentation de l'élimination urinaire du zinc [6] est également compatible avec ces résultats: on sait que les perturbations de la fonction rénale sont très précoces au cours du diabète. Il semble qu'un très fort pourcentage de diabétiques présente déjà une nette augmentation de l'albuminurie vraie au moment où le diagnostic du diabète est posé [16]. La filtration glomérulaire qui devient moins efficace laisse fuir les protéines selon le critère de leur dimension. Or, à côté de l'albumine, la β 2-A et certaines globulines [14, 22] sont les premières à passer: ce sont justement celles qui semblent être les principaux véhicules du zinc. Les réserves érythrocytaires et tissulaires sont si grandes qu'il ne se produira jamais une baisse importante du taux du zinc plasmatique.

On peut enfin se demander quelle est la conséquence de ces modifications de l'affinité pour le zinc sur le comportement de l'insuline. On sait d'une part que cet ion est indispensable à sa cristallisation et d'autre part que l'on est arrivé à polymériser une insuline amorphe très pauvre en zinc jusqu'à une constante de sédimentation de 8 S [8]. Il n'est pas impossible que l'augmentation du pouvoir de fixation du zinc observée dans les cas de diabète décompensé ait une influence sur le degré de polymérisation ou d'agrégation de l'insuline dans le plasma et par conséquent sur son action, mais ce n'est qu'une spéculation.

Addendum

Sur une remarque du Prof. K. OBERDISSE, nous avons eu connaissance du travail de SCHOLTAN sur la détermination quantitative de la fixation du sulfonamide sur l'albumine humaine.

L'auteur démontre la nécessité d'obtenir un plateau d'élution du sulfonamide et de l'albumine pour estimer le pour cent de sulfonamide lié à l'albumine: il propose donc d'appliquer sur la colonne de gel la solution à séparer en un volume de 20 ml; les résultats obtenus sont alors superposables à ceux que fournit l'ultracentrifugation.

Or, la séparation entre deux substances de poids moléculaire différent est proportionnelle à la hauteur de la colonne et inversement proportionnelle au volume appliqué. Le volume intérieur du gel a donc des limites et nous avons expérimenté que la séparation entre deux substances de poids moléculaire différent est moins bonne lorsqu'on l'applique à un volume trop grand.

On peut calculer le volume intérieur et le volume extérieur d'une colonne de 50 cc (et de 28 cm de haut)

de Séphadex G-25 fin selon les formules proposées par Flodin.

$$\begin{aligned} (1) V_t &= V_o + V_i + V_g & V_t &= 50 \text{ ml} \\ (2) V_e &= V_o + K_d \times V_i & V_g &= \frac{10 \text{ g}}{1.6 \text{ g/ml}} = 6 \text{ ml} \\ (3) V_i &= a \times W_r & a &= 10 \text{ g} \\ & & K_d &= 0.9 \text{ (pour un ion dissocié)} \\ & & W_r &= 2.5 \text{ (pour g-25 fin)} \end{aligned}$$

Dans notre expérimentation:

$$\begin{aligned} (3) \text{ le volume interne } V_i &= 10 \times 2.5 = 25 \text{ ml, soit } \frac{1}{2} \text{ vol. total.} \\ (1) V_o &= V_t - V_i - V_g \\ V_o &= 50 - 25 - 6 = 19 \text{ ml.} \\ (2) V_e &= V_o + K_d \times V_i \\ V_{e(\text{zn})} &= 19 + 0.9 \times 25 = 41.5 \text{ ml.} \end{aligned}$$

Dans notre expérimentation (Fig. 1), nous avons obtenu un volume extérieur, correspondant à l'apparition des protéines, de 15 à 24 ml. Le volume intérieur correspondant à l'apparition du zinc est de 35 à 58 ml d'élué. Pour l'iode, ce volume est de 39 à 54 ml. La séparation est donc satisfaisante pour un volume appliqué de 2 ml.

Lorsqu'on augmente le volume appliqué, le volume élué par minute étant constant, il doit arriver un moment où l'espace intérieur V_i est saturé en ion zinc: les ions vont alors être entraînés avec les protéines dans le volume extérieur. Nous avons expérimenté que le pic de la substance (ion zinc) qui devrait passer à l'intérieur du gel se déplace vers la gauche et nous avons interprété ce déplacement comme une saturation de l'espace intérieur. Il nous a donc paru illusoire de tirer des conclusions précises si le pouvoir de séparation n'était pas conservé.

Notre problème porte sur le comportement du zinc. Or, le zinc, à l'encontre du sulfonamide se fixe avec une telle avidité sur les protéines plasmatiques que même à de très fortes doses, nous n'obtenons jamais une phase de zinc libre (Fig. 2). Dans l'expérience avec le sulfonamide, l'auteur cherche à estimer le pour cent qui est fixé faiblement sur l'albumine humaine. Dans notre expérimentation avec le zinc, nous avons cherché par des moyens artificiels, à séparer le zinc de sa forte liaison aux protéines.

Nous sommes bien conscients des difficultés de mesure et de comparaison entre les substances éluées (et nous en avons rencontré d'autres: en particulier l'erreur due à l'adsorption du zinc sur le gel de dextran lui-même). Mais nous estimons que le zinc séparé par l'artifice du Versenate représente une expression du pouvoir de fixation du zinc sur les protéines plasmatiques, même si l'exactitude des résultats quantitatifs n'est pas absolue.

Référence. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweiß-Körper. *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 1433 (1965).

Bibliographie

- [1] ARENS, A., H. SUND und K. WALLENFELS: Zur Frage der N-Terminalen Gruppen und des Zinkgehaltes von Alkoholdehydrogenase von Hefe. *Biochem. Z.* **337**, 1 (1963).
- [2] BARBER, A., C. DEMPSTER and N.G. ANDERSON: A gel filtration method for studies on protein iron-binding. *Clin. chim. Acta* **8**, 143 (1963).
- [3] BUTTERFIELD, W.J.H.: Hypoglycaemic effect of dimercaprol (BAL) in burned patients and in diabetes with insulin resistant hyperglycaemia. *Lancet* **1955 I**, 489.
- [4] —, and R.H.S. THOMPSON: The effect of dimercaprol (BAL) on blood sugar and pyruvate levels in diabetes mellitus. *Clin. Sci.* **16**, 679 (1957).
- [5] COHN, E.J.: In *Chemical Specificity in Biological Interactions*. R.N. Gurd ed. Academy Press New-York and London p. 1—15, 1954.
- [6] CONSTAM, G.R., W. LEEMANN und F. ALMAY: Über die Zinkausscheidung im Harn bei Diabetikern. *Schweiz. med. Wschr.* **88**, 1103 (1958).
- [7] — — — und A.G. CONSTAM: Weitere Beobachtungen über den Zinkstoff-Wechsel bei Diabetes Mellitus. *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 1104 (1964).
- [8] CUNNINGHAM, L.W., R.L. FISHER and C.S. VESTLING: A study of the binding of zinc and cobalt by insulin. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5703 (1955).
- [9] DENNES, E., R. TUPPER and A. WORMALL: Studies on zinc in blood. *Biochem. J.* **82**, 466 (1962).
- [10] ELLENBERG, M., and H. RIFKIN: *Clinical Diabetes Mellitus*. Mc Graw Hill Book Company Inc. 1962.
- [11] FLODIN, P.: *Dextran gels and their applications in gel filtration*. Pharmacia Uppsala ed. 85 pp. 1962.
- [12] GURD, F.R.N., and D.S. GOODMAN: Preparations and Properties of serum and plasma proteins XXXII. The interaction of human serum albumin with zinc ions. *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 670 (1952).
- [13] HAGEDORN, H.C., B.N. JENSEN, N.R. KRARUP and I. WODSTRUP: Protamin Insulate. *J. Amer. med. Ass.* **106**, 177 (1936).
- [14] HARTMANN, L., G. LAGRUE et J. MORETTI: Confrontation du syndrome néphrotique et de la protéinurie lordotique. *Rev. franç. Ét. clin. biol.* **3**, 1052 (1958).
- [15] HEREMANS, J.F., M.T. HEREMANS and H.E. SCHULTZE: Isolation and description of a few properties of the B 2A globulin of human serum. *Clin. chim. Acta.* **4**, 96 (1959).
- [16] KEEN, H., and C. CHLOUVERAKIS: Urinary albumin excretion and diabetes mellitus. *Lancet* **1964 II**, 1155.
- [17] MASKE, H., H. WOLFF, B. STAMPFL und F. BAUMGARTEN: Beobachtungen über den Zinkstoffwechsel beim Alloxandibetes. *Arch. Exp. Path. Pharmak.* **216**, 457 (1952).
- [18] MELTZER, L.E., F.P. PALMON and J.R. KITCHELL: Hypoglycemia induced by Disodium Ethylendiaminetetraacetic acid. *Lancet* **1961 II**, 637.
- [19] NEILANDS, J.B., and P.K. STUMPF: *Outlines of enzyme chemistry*. John Wiley and sons Inc. 2ème ed. 1958.
- [20] OKUNEWICK, J.P.: Behaviour of radiozinc in rat plasma. *Amer. J. Physiol.* **202**, 926 (1962).
- [21] — O.A. SCHJEIDE, E.N. CARLSEN and T.G. HENNESSY: Distribution of radiozinc in rat plasma. *Nature* **198**, 966 (1963).
- [22] PATTE, J.C., G. BALDASSAIRE et J. LORET: Etudes immuno-électrophorétiques de la protéinurie physiologique. *Rev. franç. Ét. clin. biol.* **3**, 960 (1958).
- [23] PORATH, J., and P. FLODIN: Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **183**, 1657 (1959).
- [24] PROUT, TH. E., S.P. ASPER, TH. LEE and B.L. RAY: Zinc metabolism in patients with diabetes mellitus. *Metabolism* **9**, 109 (1960).

- [25] PUTNAM, F.W.: The plasma proteins. Academy Press, New-York and London 1960.
- [26] SHERAGA, H.A.: Protein structure. Academy Press New-York and London 1961.
- [27] SCOTT, D.A.: Crystalline insulin. *Biochem. J.* **28**, 1592 (1934).
- [28] VALLEE, B.L., und J.H.R. KÄGI: Zur Bedeutung des Zinks im Stoffwechsel. *Schweiz. med. Wschr.* **88**, 132 (1958).
- [29] VALLE, B.L., E.C. WACKER, A.F. BARTHOLOMEY und E.D. ROBIN: Zinc metalolism in hepatic dysfunction. *New Engl. J. Med.* **255**, 403 (1956).
- [30] — — — and F.L. HOCH: Zinc metabolism in hepatic dysfunction. *Ann. Int. Med.* **50**, 1077 (1959).
- [31] VEAL, N.: Estimation of diffusible calcium by Sephadex gel filtration. En préparation. Guy's Hospital London.
- [32] VIKBLADH, I.: Studies on Zinc in blood. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **3**, suppl. 2, pp. 1—74. (1951).
- [33] WALLENFELS, K., H. SUND und W. BURCHARD: Über den Einfluß von B Z—55 auf die Aggregation des Insulins in Gegenwart von Zinkionen. *Biochem. Z.* **335**, 315 (1962).
- [34] WOLFF, H.P.: Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zinkstoffwechsels. *Klin. Wschr.* **34**, 409 (1956).
- [35] — J.G. SCHMIDT, G. ALTHAUS und M. KNEDEL: Untersuchungen mit Zinc-65 über die Bindung des Zinks an Serumeiweißkörper. *Z. ges. exp. Med.* **127**, 362 (1956).

Dr. W. DETTWYLER
Service de Médecine
Médecin-chef: P.D. Dr. B. Courvoisier
Hôpital de La Chaux-de-Fonds/Suisse