

Mémoire présenté comme Thèse de Doctorat en Sciences
- Faculté des Sciences de Lille -

50376
1950
1

50376
1950
1

Contribution à l'étude de
quelques propriétés de
l'Insuline



108 pages -

26 applications déposés

A. Beauvillain
Arthur

Mars 1950.

Rapport sur le travail
présenté par Monsieur A. BEAUVILLAIN
en vue de l'obtention du grade
de Docteur ès-Sciences naturelles

par M. P. BOULANGER

Le travail de Monsieur BEAUVILLAIN porte à la fois sur les propriétés physico-chimiques et physiologiques de l'insuline. Dans la première partie, l'auteur fait une revue générale critique très complète de l'ensemble des travaux réalisés sur les propriétés et la structure de l'insuline. Il insiste particulièrement sur l'insuline cristallisée et son activité physiologique. C'est ce point qui est repris dans la deuxième partie, où il est montré que dans certaines circonstances, on peut obtenir des cristaux d'insuline d'activité sensiblement plus élevée que les préparations-étalons. Cette constatation intéressante est à rapprocher d'observations récentes parmi lesquelles on peut citer les travaux sur le principe hyperglycémiant d'origine pancréatique. L'auteur est ainsi amené dans sa troisième partie à mettre au point une technique d'étalonnage reposant sur l'action "convulsivante" de l'insuline chez la souris. Un travail extrêmement consciencieux, méthodique et rigoureux conduit à une méthode très satisfaisante et d'une réalisation commode. Enfin, la quatrième partie du travail, est une étude de

...

l'absorption de l'insuline par voie digestive; des expériences systématiques chez le lapin ont montré que l'absorption était rapide dans certaines portions du tube digestif, et notamment au niveau du rectum. L'action de l'insuline ainsi introduite est ~~est~~^{très} précoce et l'activité peut atteindre le tiers de celle de l'insuline administrée par voie endo-veineuse. Monsieur BEAUVILLAIN apporte une contribution précieuse à ce chapitre important de la physiologie de l'hormone pancréatique.

En conclusion, l'intérêt et l'originalité du travail de Monsieur Beauvillain justifient pleinement sa présentation comme thèse de Doctorat ès-sciences naturelles.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Boulaing", with a long horizontal flourish underneath.

1

Contribution à l'étude de quelques propriétés de l'Insuline.

- Plan du mémoire

- I. Revue générale de la Toxicologie de l'Insuline
- II. Les cristaux d'insuline représentent-ils l'hormone pure ?
- III. Activité convulsivante de l'insuline cristalline et du chlorhydrate d'insuline (rat)
- IV. Absorption et action de l'insuline par l'intestin (lapin)

INTRODUCTION

L'insuline a déjà fait l'objet de nombreuses mises au point : revues et monographie, écrites par les plus grands spécialistes. Le but de ce chapitre ne sera pas tant de présenter l'ensemble des innombrables travaux qui se rapportent à la physicochimie de cette hormone et dont on trouvera la bibliographie ci-jointe, que de souligner la place privilégiée qu'elle occupe parmi les sécrétions endocrines et parmi les protides à activité biologique en général. Les travaux qui ont été effectués sur elle peuvent servir de modèle pour nombre d'autres composés naturels.

GENERALITES

Depuis que BRUNNER (1), en 1688 pratiquant l'ablation du pancréas chez le chien observe un diabète expérimental très atténué, la sécrétion endocrine du pancréas ne cesse de susciter un puissant courant d'idées.

Les premières observations se situent tout d'abord sur le plan clinique, les recherches ayant surtout trait au diabète et à ses rapports avec le pancréas. Elles s'étendent ensuite petit à petit à l'anatomie et à l'histophysiologie de cette glande. Elles aboutissent vers 1869 à la description par LANGERHANS (2) des îlots des cellules fonctionnelles déjà soupçonnées par LAGUESSE.

Pendant ce temps de nombreux auteurs tentent la démonstration expérimentale des rapports entre pancréas et diabète. C'est en 1889-1890 que Von MERING J. et MINKOWSKI O. (3), les premiers, réussissent à obtenir un diabète expérimental vrai par l'ablation du pancréas à des chiens.

Une nouvelle série de savants parmi lesquels le français HEDON (6) confirme l'existence d'une sécrétion endocrine du pancréas.

Dès lors possédant la preuve de son existence et le lieu de sa formation les auteurs s'attaquent à son isolement chimique.

On note alors un nombre important de tentatives d'opothérapie pancréatique et de séparation du principe actif, mais ce n'est qu'en Août 1921 qu'un groupe de physiologistes Canadiens : BANTING et BEST (7) d'abord, puis COLLIP, Mac LEOD, NOBLE... (8) réalisent la préparation d'extraits actifs. Ces auteurs reprenant l'idée de LAGUESSE (9) et de GLEY (10), obtiennent des préparations actives vis-à-vis du diabète expérimental en traitant d'abord des pancréas dégénérés, réduits aux îlots de Langerhans, puis des pancréas de foetus bovins, puis enfin des pancréas d'animaux adultes dont ils inactivent la trypsine en opérant en milieu alcoolique acide. L'insuline est née.

C'est au tour des chimistes à s'attaquer à ce sujet plein de promesses. La purification avance de plus en plus et en 1926 ABEL (11) et ses collaborateurs (12) obtiennent une protéine cristallisée qu'ils considèrent comme l'insuline pure.

La possibilité de travailler sur des "cristaux de protéine" phénomène extraordinaire à l'époque, et la facilité avec laquelle SCOTT (13) en 1934 en rend aisée la fabrication en grand suscite un très grand nombre de travaux parmi toutes les disciplines : physiologie, pharmacologie, chimie, physique.

Où en est actuellement le problème de l'insuline ? Et d'abord pourquoi cet enthousiasme ?

Il suffit d'avoir vu une seule fois au microscope un champ de ces magnifiques cristaux rhomboédriques pour comprendre que l'on a sous la main un matériel de choix pour l'étude, non seulement de l'insuline mais des protides cristallisés en général.

Dès que ces formes cristallographiques très purs ont pu être à volonté et facilement reproduites, les travaux se sont multipliés : pureté, constitution chimique, structure physique, propriétés optiques, autant de domaines explorés par les plus grands savants. Et débordant rapidement du cadre de l'intérêt pour l'insuline en soi, ces recherches s'élèvent à la généralisation en facilitant l'étude de la structure intime des protides.

Mais la science est fertile en revirements imprévus et, pour d'autres ^{protides} cristallisés (la pepsine par exemple), des savants ont obtenu des proportions amorphes plus actives que les cristaux correspondants. La pureté et l'identité chimique de ces composés étaient remis en question. Depuis, les nombreux cas de syncrystallisation observés dans ce domaine ont éclairci quelque peu le problème.

L'insuline n'a pas échappé à ce débat. Et si ses cristaux sont actuellement généralement considérés comme l'hormone pure ^(x) il n'en reste pas moins un certain nombre d'observations difficiles à expliquer et dont nous reparlerons plus loin.

LES SOURCES D'INSULINE

Trouvée tout d'abord dans le pancréas, l'insuline fut ensuite recherchée dans une quantité innombrable d'organes animaux et végétaux. C'est ainsi que l'on prépara des produits à activité hypoglycémiantes à partir de : pancréas de mammifères, de poissons, (flots de RENNIE), de reptiles. Capsules surrénales, foie, muqueuse gastrique, thyroïde, glandes sous-maxillaires, cerveau, placenta, poumons etc..., sang et urine, pour le règne animal.

Dans le règne végétal une foule de tissus ont été prospectés et ont donné de nombreux produits hypoglycémiantes, mais en réalité la ~~la~~ ou tout au moins son association avec le zinc.

L'activité de la ~~majeure~~ ^{majorité} partie de ces préparations ne rappelle que de loin celle, bien spécifique de l'insuline.

LES MATIERES PREMIERES INDUSTRIELLES DE
L'INSULINE

seuls En réalité, les pancréas de mammifères représentent à peu près les matières premières industrielles de l'insuline.

PANCREAS de BOVINS :

Les pancréas de boeuf pèsent en moyenne de 200 à 300 grammes. Ils sont assez peu colorés et forment la majeure partie des matières premières de l'insuline. Leur richesse est très variable suivant l'âge. Pour le boeuf adulte elle oscille entre 2.000 et 2.500 u.i./kg

Le tableau ci-dessous indique d'après FISHER et SCOTT (14) les teneurs en insuline des pancréas de bovidés (par FISHER et SCOTT)

Méthode à l'alcool-acide (↓)

Animaux	Age	Unités internationales par gramme de tissu
Fœtus de veaux.....	5 mois	29,2 - 38,8
" " "	7 mois	21,1 - 24,9
Veaux.....	8 semaines	10,4 - 12,8
Bovidés.....	2 ans	3,9 - 6,1
"	âgés	1,7 - 2,3

PANCREAS D'EQUINS

Le poids du Pancréas de cheval se situe entre 250 et 300 grammes. Ces organes ont une texture différente de celle des pancréas de boeuf. Ils contiennent des graisses plus fluides et sont en général colorés par des substances qu'il est nécessaire et difficile d'éliminer au cours de la fabrication de l'insuline. Leur richesse est également variable et va de 2.000 à 3.000 u.i./kg.

PANCREAS DE PORCINS

La récolte du pancréas du porc, organe qui pèse 70 grammes environ est plutôt moins pratiquée dans nos pays. Sa richesse est voisine de celle des autres.

En réalité c'est donc surtout au pancréas de bovidés que l'on à recours en France pour la fabrication industrielle de l'insuline. Cela tient, partie à la facilité de son traitement, partie aux conditions géographiques d'abattage. Certaines firmes, grâce à des techniques spéciales, utilisent cependant le pancréas de porc et celui de cheval.

Mais l'état de la matière première a une importance considérable sur le travail, le rendement, et en particulier sur la dernière phase de la purification : la cristallisation, sur laquelle nous reviendrons plus tard. C'est que le pancréas exocrine est riche en ferments protéolytiques qui, dès la mort de l'animal, attaquent les divers constituants organiques. C'est l'autolyse. Le dommage est que non seulement l'insuline est atteinte, ce qui fait baisser la richesse du pancréas mais les protéines constitutives elles mêmes sont touchées. Ce qui donne une série de composés de dégradation extrêmement gênants par la suite et qui diminuent encore le rendement.

FABRICATION INDUSTRIELLE DE L'INSULINE.

La fabrication de l'insuline est maintenant parvenue à un degré de perfectionnement très élevé qui en fait, avec celle du saccharose, une des industries biologiques modèles. Les nombreuses étapes qu'elle nécessite utilisent toutes les ressources de l'équipement industriel moderne ; Centrifugeuses à panier caoutchouté ; filtres-presses en bois ; Evaporateur inoxydable sous vide et à basse température ; machines frigorifiques etc...

On peut la diviser, assez arbitrairement d'ailleurs, en quatre phases :

- 1/ Fabrication de l'insuline brute titrant de 2 à 5 u.i./mg
- 2/ Obtention de l'insuline purifiée titrant de 20 à 22u.i./mg
- 3/ Préparation de l'insuline pure cristallisée titrant de 22 à 24 u.i./mg
- 4/ Mise sous forme pharmaceutique.

Nous ne nous occuperons pas de la quatrième phase qui sortirait un peu du cadre de ce ~~ouvrage~~ *travail*.

I - Fabrication de l'Insuline brute :

Il y a lieu d'inclure dans ce chapitre les conditions de récolte qui sont extrêmement importantes pour la suite des opérations.

La fixation des pancréas doit avoir lieu en moins de 1 heure 1/2 à deux heures au maximum après la mort de l'animal. Les procédés sont variables suivant le temps qui s'écoulera entre la récolte et le travail des glandes.

Divers moyens ont été préconisés :

- Liquide fixateur : alcool-acide, alcool-benzène, acides etc...

- "quick freezing" : en réalité la congélation rapide ou "quick freezing" est encore le moyen le plus efficace pour fixer et surtout conserver en bon état cette matière première extrêmement fragile. (X)

La préparation industrielle a fait l'objet d'un certain nombre de revues. ~~Le lecteur~~ ^{On} la trouvera résumée dans celle de ROMANS (R.G.)-SCOTT (D.A.) et FISHER (A.M.) (15).

Le principe sur lequel s'appuie la première phase de la fabrication de l'Insuline est de soustraire l'hormone à l'action des ferments protéolytique, trypsine en particulier.

GLEYS (10), le premier, semble y être parvenu en utilisant des pancréas dégénérés par ligature des conduits pancréatiques (pli cacheté déposé en 1905 à la société de biologie et ouvert en décembre 1922 devant cette même société.) Mais c'est à BANTING et BEST que revient le mérite d'avoir fait passer sur le plan pratique ces données

procédé très ingénieux a été breveté par les Allemands en 1912. Le pancréas est traité avec du sucre anhydre. Ce sel absorbé l'eau du sang. On obtient des galettes solides.

8

expérimentales. Aussitôt d'ailleurs, ils abandonnent cette matière première peu commode pour tenter comme nous l'avons dit plus haut l'inactivation de la trypsine en milieu acide.

Le véhicule d'extraction a fait l'objet d'un grand nombre de recherches. BANTING et BEST puis COLLIP utilisent l'alcool-acide. D'autres auteurs ont étudié les conditions expérimentales d'extraction Alcool-chlorhydrique, alcool-acétique, extraction à froid, à la température ambiante, à 38°, extraction en milieu alcalin (bicarbonate de sodium).

La substitution de l'eau à l'alcool a été également tentée : eau acidifiée par l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acide sulfosalicylique ; eau alcaline (bicarbonate de sodium)^{avec}, extraction à froid ou à chaud (75°).

Enfin certains auteurs, voulant éliminer d'emblée une masse de protéines inertes, ont mélangé directement pulpe de pancréas et acide picrique et en ont extrait l'insuline par l'acétone. Car la grosse difficulté dans cette préparation est bien de séparer l'hormone d'une fraction importante d'impuretés de nature chimique voisine. C'est ainsi que le défaut des extractions aqueuses, qui fournissent par ailleurs de bons rendements, est de donner des produits difficilement purifiables.

En définitive c'est donc surtout l'alcool-acide (acide chlorhydrique ou acide sulfurique) qui est utilisé industriellement.

On peut schématiser les opérations de la façon suivante : le liquide d'extraction est séparé mécaniquement des marcs dans des centrifugeuses à paniers caoutchoutés. Plusieurs sont nécessaires pour obtenir de bons rendements.

Les différentes liqueurs sont réunies et neutralisées à pH 8 par l'ammoniaque. On les clarifie au filtre-presse sur toile. Pour stabiliser l'insuline au cours des opérations qui suivent, on réacidifie le liquide clair ~~de~~ de couleur ambrée, par l'acide sulfurique. Il faut alors chasser l'alcool par distillation dans un appareil inoxydable et sous un bon vide de telle sorte que la température ne dépasse pas 20°C. Le concentrat se présente sous la forme d'une bouillie. On en sépare une quantité importante de lipides et de complexes lipoprotéiques plus ou moins colorés, soit par filtration, soit par centri-

9

fugation. Les protéines du "groupe insulinique" peuvent être séparées par addition d'alcool jusqu'au titre final de 80°, élimination des impuretés insolubles, puis nouvelle addition d'alcool jusqu'au titre final de 93° et récolte du précipité formé. Ce dernier est riche en insuline.

Mais on utilise plus généralement le relargage par les sels : NaCl , So^4Na^2 , $\text{So}^4(\text{NH}^4)^2$.

On obtient ainsi une insuline brute de titre généralement faible : 2 à 5 u.i/mg. On peut d'ailleurs ne pas sécher et enchaîner avec les autres étapes.

2 - Obtention de l'insuline purifiée :

Il s'agit maintenant de séparer l'insuline des protéines voisines. C'est la phase la plus délicate. Elle nécessite une série d'opérations répétées chacune 3 ou 4 fois.

Tous les moyens classiques de séparation des protéines sont utilisés, seuls ou combinés entre eux.

Précipitation sous forme de sels :

Le précipité précédent est dissous dans l'eau plus ou moins acidulée et reprécipité par les acides picrique, ou flavianique ou trichloracétique, ou oxalique etc..., l'insuline étant par la suite dégagée de ces combinaisons.

Précipitation par l'alcool :

On utilise l'alcool éthylique à différents titres et en faisant varier le pH.

Précipitation au point isoélectrique :

Les précipités précédents sont dissous dans des systèmes tampon divers : phosphate, borate, oxalate, acétate, ... et l'ensemble est ajusté à des pH allant de 4,5 à 6,5 suivant les produits et les auteurs.

Adsorption : L'insuline est adsorbée sur kaolin, charbon, acide benzoïque, alumine, etc..., et des liquides divers peuvent être utilisés pour l'élution.

Au fur et à mesure que l'on pratique ces opérations et qu'on les combine entre elles, l'insuline se débarrasse de ses impuretés, elle est de moins en moins colorée, de plus en plus active. On aboutit finalement à une poudre blanche, amorphe, peu hygroscopique, titrant 20 à 22 u.i./mg.

3 - Préparation de l'insuline cristallisée :

En 1926, au cours de l'étude de la libération de H_2S qui accompagne l'inactivation de l'insuline par les alcalis, guidés par les travaux de SCOTT (16), et disposant d'une quantité de substance suffisante, ABEL (11) obtient le premier des cristaux d'insuline.

Son procédé qui n'a plus qu'une valeur historique, utilisait l'acétate de brucine et la pyridine. La cristallisation était lente, les rendements désastreux. Mais ABEL avait le premier réussi à obtenir une protéine cristallisée et douée d'une activité physiologique puissante. Cette découverte devait avoir un retentissement considérable.

D'autres auteurs GERLOUGH et BATES (17) - HARRINGTON et SCOTT (18), lui succèdent, qui emploient la saponine et la digitonine au lieu de la brucine.

Mais c'est SCOTT (13) qui en montrant le rôle fondamental du zinc dans la cristallisation a fourni à l'industrie le moyen de préparer l'insuline cristallisée par grosse quantité et avec des rendements intéressants. Actuellement la plupart des procédés de cristallisation industrielle sont basés sur les travaux de SCOTT.

On place l'insuline purifiée en milieu tamponné et en présence d'un peu d'acétone pH⁶-6,2. Ce sont surtout les tampons de phosphate qui sont utilisés. Le zinc est apporté à l'état de chlorure ou de sulfate.

Les cristaux se déposent en même temps qu'une petite quantité de substance amorphe. On élimine cette dernière en répétant plusieurs fois l'opération.

L'obtention de cristaux absolument purs de toute gangue amorphe exige de présenter au milieu de cristallisation des produits déjà suffisamment purifiés. Le rendement final dépend lui aussi

beaucoup de la nature des produits mis initialement à cristalliser.

Les cristaux purs obtenus titrent généralement 22u.i./mg.

Mais nous verrons plus loin qu'ils peuvent être parfois plus actifs.

Le tableau ci-dessous donne d'après ROMANS (R.G.) et ses coll. (15)

les rendements industriels de ces opérations :

Insuline préparée à partir
de pancréas de boeuf.

Lots	Insuline cristallisée	Insuline non cristallisée	Total.
A	2.033.000	77.000	2.110.000
B	1.901.000	274.000	2.175.000
C	2.042.000	--	2.042.000

Chaque lot correspondant à 1.089 kg de pancréas. Les nombres ^{du tableau} des colonnes sont exprimés en U.I.

- PROPRIETES -

Remarques :

Quelle qu'en soit la source ; boeuf, bison, porc, agneau, poisson, homme etc... l'insuline présente toujours les mêmes propriétés physiques, chimiques, ^(x)physiologique, immunologiques. SCOTT et FISHER (19) WASSERMAN et MIRSKY (20)

Réactions de caractérisation :

Réaction colorées : d'après JENSEN.

Positives : biuret - Millon - Pauley - Ninhydrine - Xantoprotéique-Sakaguchi (arginine) - Folin-Looney (liaison disulfure et tyrosine) - Sullivan (cystine) negatives : Voisonet - Hopkins Acree (tryptophane) - Mollish (hydrates de carbone) Après réduction, le test des groupes - SH est positif.

avant de... :

Réactions de précipitation :

L'insuline est précipitée de ses solutions aqueuses par les acides tungstique, phosphorique, trichloroacétique, tannique, picrique, flavianique etc...

Composition chimique élémentaire :

Azote total : 15,4 % (ABEL) (21) - 14,03 % et 14,49 % (HARRINGTON et SCOTT-22)

15,69 % (JENSEN, WINTERSTEINER et GEILING (23).

Des recherches personnelles nous ont donné : 14,8 % pour une insuline à 22u.i./mg. et 13,2 % pour une autre à 30 u.i./mg.(p.29).

Répartition de l'azote dans l'insuline cristallisée

d'après WINTERSTEINER O., JENSEN H., et DU VIGNEAUD V. (24)

	% de l'azote total
N ammoniacal	9,58
N humique	2,42
N de l'arginine	6,60
N de la cystine	6,08
N de l'hystidine	7,60
N de la lysine	2,76
N aminé dans le filtrat	56,30
N non aminé dans le filtrat	8,31
N total identifié	99,65
N total théorique	100

Carboné : 52,5 %

Hydrogène : 6,8 %

Soufre : 3,2 %

La presence de soufre dans l'insuline a fait l'objet de nombreuses recherches, pour savoir sous quelle forme il pouvait être combiné. En définitive, MILLER et du VIGNEAUD (25) ont montré que cet élément se trouvait quantitative-ment inclus dans la cystine.

Zinc : Une mention toute spéciale doit être faite pour le zinc. Bien que la présence de ce métal ne soit pas nécessaire pour l'activité hypoglycémiant (il ne fait que la prolonger légèrement), elle est indispensable pour la cristallisation. Ce métal peut être remplacé par le nickel, le cobalt, le cadmium. Ces 4 éléments se trouvent d'ailleurs à l'état naturel dans le pancréas (environ 20mg. par kg de glandes fraîches). Les travaux récents auraient montré que les pancréas d'individus normaux ou de diabétiques contiennent d'ailleurs la même quantité de ce métal (18,5 à 30,4 mg par kg de glandes fraîches) (EISENBRAND J. et SIENZ M.26)

D'après ces derniers auteurs le complexe zinc-insuline serait analogue au complexe zinc-glycine. La teneur en zinc de l'insuline dépend des traitements préliminaires. A saturation, EISENBRAND et coll.(27) ont trouvé des quantités allant jusqu'à 3,5 % pour l'insuline amorphe. Pour l'insuline cristallisée ces mêmes auteurs ont indiqué 1,73 % . Le premier chiffre de SCOTT était de 0,52. Récemment COHN E.J. FERRY J.D. LIVINGOOD J.J. et BIANCHARD (M.H.) (28) (29) ont étudié les variations de la teneur en zinc en utilisant le zinc radio-actif. Ils ont montré que le pH de cristallisation avait une influence prépondérante . A pH inférieur ou égal à 5,5 , la teneur est de 0,34 % quel que soit l'excès de zinc en solution. Au-dessus, le pourcentage est plus élevé : environ 0,6.

Des lavages répétés font décroître le pourcentage sans descendre au-dessous de 0,3. Par ailleurs, la proportion ne dépasse jamais plus de 2 atomes de métal par molécule de protéine. Un autre savant SAHYUN (30) ^{serait} est parvenu à préparer une insuline cristallisée ne contenant que 0,15 % de zinc.

Composition en acides aminés : Le tableau ci-dessous indique les teneurs des différents amino-acides isolés et identifiés.

<u>ACIDES AMINES</u>	<u>%</u>	<u>AUTEURS</u>
Leucine	30	(31)
Acide glutamique	21	(32)
	30	(31)
Cystine	12,6	(31)
	12,5	(36)
Tyrosine	12,5	(36)
	12,2	(31)
Proline	10	(33)
Histidine	8	(31)
	10,7	(36)
Arginine	3	(34)
	3,22	(31)
	3,05	(36)
Lysine	2	(35)
	2,26	(31)
	1,26	(36)
Phénylalanine	1	(33)
Sérine	3,57	(37)
Thréonine	2,66	(37)

Les avis ont été un instant partagés au sujet de la méthionine. En fait, les derniers travaux de Du VIGNEAUD (31) et de FREUDENBERG (38) indiquent sa présence comme impureté dans l'insuline amorphe et concluent à son absence dans l'insuline cristallisée.

DISTRIBUTION DES AMINO-ACIDES DANS L'INSULINE
 (d'après Du VIGNEAUD V.) (31)

Amino-acide	% de résidus d'acides aminés		Molécules de résidus d'acides aminés		Règle de BERGMANN 2n' x 3m'
	expérimentaux	(x) calculés	expérimentaux	(x) calculés	
Lysine	1,98	2,20	5,4	6	2 ^I x 3 ^I
Arginine	2,88	2,66	6,5	6	2 ^I x 3 ^I
Histidine	7,10	7	18,2	18	2 ^I x 3 ²
Tyrosine	II	II,20	23,6	24	2 ³ x 3 ^I
Cystine (en cystéine)	10,70	10,50	36,6	36	2 ² x 3 ²
Ac. glutamique	26,30	26,40	71,6	72	2 ³ x 3 ²
Leucine	25,90	23,20	80,4	72	2 ³ x 3 ²
Phénylalanine	?	-	-	-	!
Proline	?	-	-	-	!
	!	!	!	!	!
Total	85,86	83,16	242,3	234	!
Total théorique	--	100	-	288	!
	!	!	!	!	!

(x) calculé d'après un poids moléculaire de 35.100

Le mode de liaison des différents amino-acides a été également prospecté ces dernières années. BATH J. et ELLIS (39) grâce au spectre d'absorption infra-rouge pensent que les groupements-OH dont ils ne trouvent pas les bandes sont bloqués par les liaisons entre acide-aminés GRAMMER J. et NEUBERGER A. (40) sont en accord avec eux. L'étude du spectre d'absorption dans l'U.V. leur fait croire aux liaisons des groupements phénoliques.

Le nombre des liaisons peptidiques par molécules est de 292 ± 10 si l'on se base sur un poids moléculaire de 37.000 (rappelons le chiffre théorique de 288 pour la molécule de SVEDBERG, postulé par BERGMANN).

Enfin se basant sur le nombre des groupements aminés libres CHIBNALL A. (36) pense que la molécule d'insuline serait formée de 18 chaînes polypeptidiques courtes et séparées.

Solubilité :

Soluble en milieu alcalin et en milieu acide, elle l'est également dans le phénol à 90 % et dans l'alcool dilué.

On connaît sa solubilité dans les tampons d'acétate de pH 4,8 à pH 6,5 (0,0004 %) et dans des solutions salines de concentration diverses.

Propriétés physico-chimiques :

Pouvoir rotatoire : WINTERSTEINER (41) - FREUDENBERG (38) et coll.

- dans HCL : solution à 2,5 % dans HCL N/10: $\alpha \frac{22}{D} = -29^{\circ}$ passant à $-31^{\circ},7$ au bout d'une semaine.

- dans NH^4OH : solution dans NH^4OH N: $\alpha \frac{21}{D} = -49^{\circ}$ s'élevant lentement, au cours des premières 48 heures.

- dans NaOH : solution à 2,5 % dans NaOH N/10: $\alpha \frac{23}{D} = -80^{\circ}$ s'élevant légèrement pendant les 30 premières heures.

Point Isoélectrique :

La zone d'insolubilité est très large : pH 4,5 à 7 ; celle de cristallisation plus étroite : pH 5,8^{à 6} suivant le milieu (SCOTT et FISHER) (12). Le point isoélectrique est estimé à 5,3 - 5,35 (WINTERSTEINER et ABRAMSON (43) - HOWIT et PRIDEAUX (44)). Des mesures portant sur une insuline cristallisée à 24u.i/mg nous ont donné 5,55 à 5,75.

17

Absorption dans l'ultra-violet :

La bande d'absorption comprise entre 2.500 et 2.900Å est généralement rapportée à la cystine et à la tyrosine. Le diagramme ci-dessous montre une bande à 2.780 Å que nous avons obtenue avec une insuline à 28 u.i./mg.

A ce sujet, signalons l'inaction produite par les rayons U-V en présence d'oxygène. D'après FREUDENBERG et ses coll. (45) une modification du spectre U.V. serait toujours l'indice d'une inactivation, mais celle-ci ne s'accompagne pas forcément d'une modification du spectre.

Absorption dans l'infra-rouge :

D'après BATH J.W. et ELLIS J.W. (39) le spectre d'absorption dans le proche I.R. ne serait pas différent de celui des autres protéines. Le diagramme ci-dessous montre le spectre d'absorption I.R. obtenu avec l'insuline cristallisée la plus pure que nous avons à notre disposition à une époque voisine (28 à 30 u.i/mg). On note une bande très nette à 6,43 μ et une légère dépression à 8,05 μ .

Diffraction par les rayons X.

La diffraction par les rayons X a été étudiée par différents auteurs. Mais les diagrammes sont difficiles à lire sinon à obtenir. C'est ainsi que les premiers essais ont été infructueux.

GEORGE 1928 -(46) FREUDENBERG (47) 1930-SCOTT 1930 (48). En 1932 CLARK et CORRIGAN (49) obtiennent des résultats positifs. Ils décrivent une maille monoclinique formée de 26 molécules.

Si l'on emploie la méthode des poudres (technique de DEBYE et SHERRER) on obtient 2 anneaux diffus (voir fig.)

Enfin dès 1935, Miss COXFOOT (50,51,52,53) opérant sur un seul cristal montre que la maille de l'insuline est rhomboédrique. Constituée par une seule molécule elle aurait

comme paramètre $a = 44,3 \text{ \AA}$ - comme angle $\alpha: 115^\circ$. Elle renfermerait une unité SVEDBERG et aurait un poids moléculaire de 37.000.

En utilisant les résultats de l'étude roetgenographique de CRAWFOOT et RILLEY (52), BERNAL J. (54), suggère que la molécule d'insuline pourrait contenir 18 sous-unités. Toutefois d'après ASTBURY (55) il ne semble pas y avoir de relation entre les observations aux rayons X et le nombre des chaînes peptidiques.

Enfin citons les travaux de Miss WRINCH D. (56) qui applique à l'insuline sa théorie du cyclol. L'hormone pourrait être figuré par le cyclol C_2 .

Poids moléculaire :

Les mesures anciennes ont donné des chiffres très variés allant de 20.000 à 50.000 (FREUDENBERG (57)- SVEDBERG(58) CROWFOOT (50) et GERLOUGH (59). La valeur la plus communément admise était de 35 à 36.000. Récemment MILLER G.L. et ANDERSON (60) utilisant la mesure de la sédimentation par ultracentrifugation et des constantes de diffusion de l'insuline 2 fois recristallisée, obtiennent une valeur de 46.000.

Electrotitrimétrie :

D'après le pouvoir de liaison en solution alcoolique à 80 % et en solution aqueuse HARRIGTON et NEUBERGER (61) ont calculé que l'insuline avait une capacité de liaison acide de 43 ± 2 groupes par molécule et de liaison basique de 60 à 70 groupes par molécules.

Rappelons ici que l'examen des groupes ionisables fait supposer l'existence de 18 chaînes polypeptidiques.

Adsorption :

Comme nous l'avons déjà vu au cours de sa séparation l'insuline s'adsorbe dans certaines conditions sur des adsor-

19

bants variés : réactif de Lloyd, charbon, kaolin, alumine C ,
acide salicylique, acide benzoïque.

Electrophorèse et dialyse :

Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont assez
contradictoires.

Citons enfin pour terminer les études de WAUGH D.F.
(62) (63) sur la dénaturation par la chaleur et sur les gels
d'insuline.

Les cristaux d'insuline :

Les cristaux d'insuline ont été décrits par E.B. ...
MATHEWS, professeur de Géologie (64) à l'université John
HOPKINS.

D'après SCOTT (65), on peut les classer en deux groupes :

- cristaux à caractères rhomboédriques, biréfringents.
- cristaux affectant des formes variées ; aiguilles,
coins, dent de chien" etc... peu biréfringents.

On obtiendrait les premiers à pH 6,2 , les deuxièmes
à pH 5,2, le passage des deuxièmes aux premiers étant facile,
mais l'inverse impossible.

D'après nos multiples observations, le pH ne nous
paraît pas être le facteur essentiel du choix par l'insuline
de sa forme cristalline. En effet nous avons pu parfois obser-
ver des aiguilles aux pH 5,9-6, et 6,5 ; d'autre part nous
avons pu obtenir des préparations rhomboédriques pures à 5,7 -
5,3 - et même au-dessous.

A la suite de l'examen d'un très grand nombre de prépa-
rations il semble que dans les cas où la cristallisation est
gênée, en particulier par la présence d'impuretés protéiques,
modifiant le milieu de cristallisation au point de vue physico-
chimique, l'insuline délaisse la forme rhomboédrique et cristal-
lise volontiers en prismes ou en coins.

Au contraire, quand les produits sont purs il est as-
sez difficile de reproduire ces dernières formes. Pour les ob-
tenir en évitant les rhomboédres, il faut alors se placer à

un pH très bas.

Tout porte à supposer que l'insuline a tendance à cristalliser en rhomboédres, sa forme normale. Mais si les conditions de cristallisation sont mauvaises, elles empêchent le plein épanouissement du cristal rhomboédrique, riche en éléments de symétrie et ne laissent se former que des formes pauvres en ces éléments.

Dans les préparations pures, les cristaux se présentent comme une association de deux rhomboédres surbaissés, quelquefois identiques, quelquefois de taille différente. L'association de ces "jumeaux" se fait par décalage des deux cristaux l'un par rapport à l'autre le long de l'axe de symétrie ternaire. Ce décalage est de faible amplitude. C'est pourquoi on ne s'en aperçoit que si le cristal bascule car la transparence et les manifestations colorées dues aux interférences font que les arêtes superposées et très voisines se confondent. On ne semble voir qu'un élément. (figure). Si les cristaux sont de taille inégale l'association se faisant toujours suivant A^3 , la projection orthogonale donne deux hexagones (figure.).

RAPPORT ENTRE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET L'ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE

Les nombreuses recherches en vue d'élucider les rapports entre la constitution de l'insuline et ses activités physiologiques peuvent servir d'exemple aux investigations de ce genre pour d'autres produits biologiques actifs. Disons tout de suite que malgré tout le soin et toute la perfection technique apportés à ces expériences, bien qu'un rayon de lumière ait été jeté sur l'ensemble du sujet, beaucoup de points restent obscurs.

I - Etude des groupements et des liaisons :

A/ Action des Enzymes :

Les principaux enzymes ont été essayés. l'insuline est inactivée plus ou moins profondément mais la réversibilité du phénomène fait l'objet d'opinions contradictoires.

Pour certains auteurs la pepsine, la trypsine, inactivant l'hormone de façon irréversible. Pour d'autres il y aurait possibilité de réactivation tout au moins partielle. C'est ainsi que EPSTEIN et ROSENTHAL (66-67) sont partisans de la réversibilité ainsi que SCOTT (68) tout au moins en milieu acide.

Les études les plus poussées ont été faites par FISHER et SCOTT (69) CHARLES et SCOTT (70) et surtout par FREUDENBERG et ses collaborateurs (71-72). Ces derniers ont montré que si l'enzyme ne touche pas à la structure, l'activité reste inchangée (dipeptidase, trypsine sans kinase, aminopolypeptidase Mais s'il y a hydrolyse l'activité disparaît (papaïne, pepsine trypsine avec kinase, etc...).

L'hydrolyse et l'inactivation ont des termes de réaction différents. À lors qu'avec la papaïne il reste toujours une légère activité (10 %) après hydrolyse, celle-ci continue après l'inaction totale si l'on utilise la pepsine et la trypsine-kinase. Il faut supposer avec ces auteurs que les Enzymes attaquent d'abord les liaisons d'une grande importance au point de vue physiologique.

Dans le même ordre d'idées on a essayé l'action de différents tissus et liquides organiques. L'inactivation que l'on observe alors provient vraisemblablement de l'action des enzymes contenus dans ces substances.

B/ Action d'autres réactifs :

1°) - Attaque des groupements aminés :

Anhydride acétique A froid l'anhydride acétique donne un dérivé acétyle dont l'activité est très faible sinon complètement nulle. On peut obtenir une réactivation partielle

22

par hydrolyse. L'acétylation porte sur les groupes amine imine, et hydroxy. D'après FREUDENBERG et ses collaborateurs (73-74) la réactivation serait le résultat de l'hydrolyse des dérivés des deux derniers groupements plutôt que ceux du premier.

Iodure de Méthyle : En milieu alcool-acide CHARLES et SCOTT (75) ont observé une inactivation réversible. JENSEN et ses coll. (76) ont étudié très soigneusement la réaction. Au cours de la méthylation, le taux de cystine baisse. Les auteurs expliquent cette chute soit par destruction des ponts -S-S (action oxydante de I, formé aux dépens de ICH_3 par oxydation) soit par action de HI formé aux dépens de ICH_3 et agissant sur les groupes hydroxy et carboxy.

Par ailleurs HI inactive l'insuline sans changement du taux de l'azote aminé et du taux de la cystine. Par contre si l'on opère sous oxygène, l'azote aminé et la cystine baissent.

Enfin l'iodure de Méthyle ne provoque pas de changement dans le taux d'azote aminé ce qui signifie que les groupes aminés libres ne sont pas méthylés.

Aldéhydes : En solution alcaline l'aldéhyde formique inactive l'insuline. Les acides dilués, à 100° , restaurent 60 % de l'activité initiale. La cystine et l'azote aminé diminuent au cours d'une réaction dont on ignore le mécanisme exact.

Les aldéhydes aromatiques comme la benzaldéhyde et la chlorobenzaldéhyde en milieu alcalin inactivent l'hormone de façon irréversible. Pour FREUDENBERG et ses collaborateurs (57-74) cette action serait due aux impuretés (peroxydes) alors que pour JENSEN et de LAWDER (77) elle le serait à la suite du blocage des groupes aminés libres.

Acide Nitreux : Si l'on fait agir l'acide nitreux en solution dans l'acide acétique ou l'alcool méthylique, on aboutit à une inactivation. FREUDENBERG et ses coll. (57) n'ont pas noté de diminution des groupes aminés.

23

JENSEN et ses collaborateurs (76) ont approfondi le problème. Si l'on opère en milieu acétique (1 heure 1/2) ou en solution dans l'alcool méthylique (3 heures) l'activité baisse légèrement tandis que l'azote aminé chute de façon peu notable. Il faudrait supposer que ceux des groupements aminés qui sont bloqués ne supportent pas l'activité physiologique. Mais si l'on prolonge l'action en milieu acétique l'activité baisse et s'accompagne d'une chute parallèle de l'azote aminé.

Isocyanates : les isocyanates aromatiques en solution alcaline détruisent 95 % de l'activité. L'azote aminé baisse, la cystine reste constante, et il n'y a pas de production d'ammoniaque. Si l'on hydrolyse en milieu acide ces dérivés, on tombe sur l'hydantoïne de la phénylalanine. Ce qui doit signifier que cet acide amine apporte un certain nombre des groupements libres dans la molécule de l'insuline.

2°) Action des oxydants :

Iode : Par l'action de l'iode en solution alcaline, l'inactivation intervient rapidement et de façon irréversible. L'oxydation des ponts -S-S est révélée par la diminution du taux de cystine.

La participation des groupes phénoliques à l'activité de l'insuline est démontrée par les travaux de HARRINGTON et NEUBERGER (61). Utilisant la méthode de NEUBERGER (48), ils substituent les groupements tyrosiniques. Le dérivé iodé ne possède plus que 10 % de l'activité initiale. Si par réduction catalytique on déplace l'iode, on restaure une fraction importante de l'activité.

Signalons ici l'utilisation récente de l'insuline "marquée" par l'iode radio-actif, dans l'étude de l'absorption et du sort de l'hormone dans le corps. REINER L. KESTON A.S. et GREEN M. (79) - ROOT H.F. IRVING J.W. EVANS R.D. REINER L. et CARPENTER T.M. (80).

D'autres oxydants : inactivent l'insuline : benzoyl-peroxyde, oxyde mercurique, ferricyanure en solution alcaline etc....

3°) Action des réducteurs :

L'inactivation est irréversible quand elle est provoquée par des réducteurs tels que : acide thioglycolique, acide thiolactique, acide thiosalicylique, glutathion cystéine. Ces composés contenant dans leur molécule des groupements -SH attaquent spécifiquement les ponts -S-S-. Mais il n'y a pas de relation directe entre la réduction complète et l'inactivation totale. Pour WINTERSTEINER (81) cette dernière est atteinte quand le tiers du soufre est réduit. Pour FREUDENBERG et EYER (74) il suffit de réduire 1 ou 2 groupements -S-S- pour inactiver complètement l'insuline.

STERN et WHITE (82) obtiennent des résultats identiques avec l'acide thioglycolique à pH 2.

L'insuline réduite par la cystéine et partiellement inactivée, peut être en partie réactivée par addition de H₂O₂. FREUDENBERG K et MUNCH A (83)

4°) Action des acides :

Celle-ci est dominée par l'obtention du "Heat précipitate", lors de l'ébullition de l'insuline en présence d'acide chlorhydrique N/10. On note un dégagement d'azote provenant du groupe amide de la fraction glutaminique. Ce nouveau composé est inactif, mais on peut lui rendre son activité par traitement avec un alcali dilué.

D'après du VIGNEAUD et ses coll. (84) il serait spécifique de l'insuline et tous les groupements actifs de la molécule participeraient à sa formation. Celle ci parait liée à l'intégrité d'un certain nombre de groupements aminés et de ponts -S-S- (JENSEN et coll. (76)

L'alcool-acide provoque également une inactivation.

On restaure partiellement l'activité par traitement avec un alcali dilué. Le mécanisme de ce phénomène est inconnu.

5°) Action des alcalis :

L'ammoniaque suffisamment concentré amène la perte de l'activité. Les avis sont très partagés sur les possibilités de réactivation. Impossible pour JENSEN et collaborateurs, elle pourrait être obtenue par l'action de composés à groupement SH et par H₂O₂. ^{d'après} (FREUDENBERG B ET WEGMANN (85)). Toutefois le premier nommé ^{de ces derniers auteurs} a récemment infirmé ces derniers résultats (FREUDENBERG et MUNCH (86)).

Elle s'accompagne d'une production d'ammoniaque provenant des groupements aminés (baisse de l'azote aminé) et de la cystine.

Du VIGNEAUD V. BROWN G.B. ET BONSNES R.W. (87) ont isolé à partir de l'insuline attaquée par un alcali dilué des quantités importantes de lanthionine.

6°) Divers : Le diazométhane amène une étherification et une méthylation. L'insuline est partiellement inactivée et perd une partie de sa cystine et de son azote aminé.

Enfin la benzoquinone l'inactive en solution alcaline.

II - Préparation des dérivés :

Dans la plupart des cas il suffit de procéder à des substitutions chimiques pour avoir diminuer l'activité. Ont été ainsi préparés des azo-dérivés contenant jusqu'à 15 azo-groupes par molécule. Certains de ces dérivés ont été obtenus cristallisés. La substitution par des groupes azo-positifs amène une baisse d'activité généralement plus grande que celle provoquée par les substituants négatifs. REINER et LANG (88) LANG et REINER (89) - REINER KESTON et GREEN (90) -

Enfin SCOTT et FISHER (91) ont réussi à cristalliser en présence de ou sans zinc des complexes d'insuline et de pipéridine. Les

cristaux perdent leur activité quand on les sèche.

III - Essais de synthèse :

Ces tentatives qui résoudraient les inconnues de la constitution chimique et donneraient en même temps le moyen d'obtenir économiquement un produit très important au point de vue thérapeutique sont restées jusqu'ici infructueuses.

Etant donné l'importance considérable du soufre contenu dans l'insuline et de la cystine qui supporte cet élément on a cherché à obtenir des dérivés de cet amino-acide qui pourraient avoir une activité insulinique.

C'est ainsi que les produits suivants ont été étudiés : diglycylcystine, diglutamylcystine, cystinyldiglycine, diglytominylcystine, cystinyldiglutamine, dialanylcystine.

Aucun de ces composés ne s'est montré hypoglycémiant. Mais il est évident que les possibilités de combinaisons à partir de la cystine et d'autres amino-acides sont immenses. Seule la connaissance de la structure chimique et physique de la molécule pourrait guider les chercheurs dans cette voie. Malheureusement il n'existe pas à l'heure actuelle de technique assez fine permettant de pénétrer dans l'intimité même de composés aussi complexes que les protéines.

Des essais de synthèse enzymatique ont également été tentés. Ainsi FISHER et SCOTT (92) ont tenté de réassembler les produits de dégradation pepsique de l'insuline par la pepsine dans des conditions déterminées. Ils ont bien obtenu une protéine amorphe mais douée d'aucune activité hypoglycémiant. Citons ici les travaux récents de HADDOCK J.N. et THOMAS L.E. (92)

A la suite de ces multiples travaux une remarque s'impose. Plus que les groupements, les liaisons et les amino-acides formant l'édifice complexe de l'insuline, l'organisation générale de ces différents constituants, leur position spatiale relative ainsi que celle des liaisons et des radicaux libres est d'importance fondamentale.

Il suffirait pour s'en convaincre de remarquer que des produits biologiques doués d'activités physiologiques intenses et aussi

27

différentes que celles de l'insuline et de l'hormone ocytocique posthy saire, renferme sensiblement dans leur molécule les mêmes éléments.

IV - Connait-on actuellement l'identité de l'insuline pure ?

Aucune des notions précédentes ne nous a donné de preuves indubitables qu'il y ait dans la molécule d'insuline une substance, un groupement prosthétique, des groupes ou des liaisons vraiment spécifiques responsables de l'activité physiologique de l'insuline.

Il est donc nécessaire de passer en revue une dernière série de travaux et d'hypothèses.

1°) Etude des cristaux :

On s'est demandé longtemps si les cristaux représentaient bien l'hormone elle-même et non pas un simple substratum à la surface duquel serait adsorbée la substance active.

Cette hypothèse est facilement combattue par un certain nombre d'observations.

Le nombre des cristallisations successives n'influe pas sur l'activité des cristaux. D'autre part quelque soit l'origine de l'insuline (P.II) et les méthodes de cristallisation utilisées, les cristaux se présentent toujours sous les mêmes formes cristalligraphiques et possèdent la même activité. De même si l'on adsorbe l'hormone et qu'on l'élue, la cristallisation du nouveau produit redonne les mêmes cristaux, de même activité. Enfin, après une inactivation légère et réactivation consécutive, la forme cristalline et l'activité sont les mêmes qu'initialement.

2°) Essais de dissociation de la molécule :

Entre les mains de SJÖGREN et SVEDBERG (158) l'ultracentrifugation a montré que l'insuline reste homogène dans une zone de pH de 4,5 à 7. En dessous il y aurait une dissociation réversible en particules plus petites sans changement sensible de l'activité.

Recentment MILLER et ANDERSSON (94) étudiant l'ultracentrifugation de l'insuline réduite par l'acide thioglycolique ont montré que la majeure partie de la protéine s'agrégeait en particules à poids moléculaire plus élevé et seulement une petite fraction en particules à poids moléculaire plus bas. Ils ont noté une diminution parallèle de

28

l'activité biologique et l'apparition de nombreux groupes thiols. Ces résultats appuient l'hypothèse que l'activité biologique est fonction de la grandeur moléculaire.

Rappelons ici les travaux déjà anciens de DINGEMANSE et collaborateurs (95) travaux extrêmement controversés. Ces auteurs ont en effet affirmé avoir obtenu des insulines amorphes 4 fois plus actives que l'insuline cristallisée, ce qui militait en faveur d'un groupement prosthétique actif couplé avec une protéine inactive. Ces résultats d'une importance capitale ont incité plusieurs laboratoires à répéter ces expériences. mais en utilisant la technique et les produits mêmes de DINGEMANSE, des savants aussi expérimentés que du VIGNEAUD V. et ses coll. n'ont pas réussi à confirmer les résultats initiaux.

Ainsi depuis les mémorables travaux de BANTING et BEST, c'est à dire depuis un quart de siècle, grâce au concours de grands savants comme d'humbles chercheurs, résultat de la confrontation des principales disciplines scientifiques, s'est dégagée petit à petit la physiologie attrayante de cette hormone protéidique.

De constitution chimique et de propriétés physicochimiques constantes quelle que soit son origine, elle présente une activité remarquable et stable. Elle nous apparait suivant les conceptions modernes comme un massif harmonieux dont les parties constitutives sont liées entre elles suivant un plan rigoureusement déterminé qu'il ne faut en aucun cas troubler sous peine de voir l'activité disparaître.

Présentées ainsi, ces connaissances pourraient faire croire qu'il n'y a plus rien à apprendre sur l'insuline et l'on serait tenté de répondre affirmativement à la question qui constitue le titre de ce paragraphe.

Mais la nature souvent nous séduit pour mieux nous tromper. Peut-être existe-t-il des fissures dans ce monument scientifique ?

Car il nous faut noter ici, pour terminer que quelques auteurs ont remarqué depuis la standardisation rigoureuse et la création d'un étalon international, que certains lots de cristaux d'insuline montrent une activité hypoglycémiant nettement plus élevée que les cristaux du standard.

En 1941 nous avons réussi à isoler, à partir d'eaux-mères de cristallisation, de très petites quantités de cristaux d'activité voisine de 30 unités internationales au mg., c'est-à-dire s'écartant d'une valeur caractéristique eu égard aux sensibilités des méthodes de titrage employés.

Ces cristaux avaient une teneur en azote relativement faible (13,2 %) par rapport à celle de l'insuline cristallisée à 22 u.i/mg (14,8 %) *dont nous étions fiers.*

Si les spectres dans l'U.V. sont identiques, par contre le spectre I?R. montre la disparition de 2 bandes dans le cas de l'insuline la plus active.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène :

-La syncristallisation de 2 substances d'activités différentes (98)

-Une modification de structure (racémisation par exemple) au cours de la préparation. (JENSEN)

Les faits rapportés ci-dessus semblent militer en faveur de la première hypothèse. La Syncristallisation est d'ailleurs maintenant un phénomène courant pour ce genre de composé.

Ce nouveau problème est tentant mais il est facile de deviner les difficultés auxquelles se heurtent les essais de séparation de fractions éventuelles : manipulation de grosses quantités d'un produit très rare et très précieux, et méthodes de standardisation extrêmement rigoureuses, portant sur de grands nombres d'animaux.

Ainsi ce protéide cristallisé dont la physicochimie est probablement la plus parfaitement connue, peut nous servir d'exemple jusque dans la leçon d'humilité qu'il nous donne : à savoir que les notions les mieux acquises doivent sans cesse être révisées ou confirmées périodiquement à la lumière des connaissances nouvelles et à l'aide de techniques en perfectionnement continu.

LES CRISTAUX D'INSULINE REPRESENTENT-ILS L'INSULINE PURE ?

L'ampleur des travaux effectués sur l'insuline et les noms prestigieux qui y sont associés n'ont cependant pas entièrement éclairé ce domaine. Un certain nombre de points restent encore incertains. Nous avons voulu, dans la mesure de nos modestes moyens, apporter notre contribution à ce problème.

Les expériences que nous rapportons ici ont été poursuivies dans plusieurs directions : étude des propriétés physicochimiques, de l'action convulsivante et de l'activité par la voie digestive de l'insuline.

INTRODUCTION

Quand on examine la littérature scientifique qui porte sur la constitution physico-chimique de l'insuline, on rencontre une foule de travaux dont beaucoup sont contradictoires, laissant ainsi autant de questions fondamentales sans réponse.

Essayons d'en brosser un tableau sommaire et objectif.

Il semble bien admis maintenant que la protéine insulinique représente l'hormone elle-même et non pas un simple substratum à la surface duquel serait adsorbée la substance active.

Par contre, l'opinion parfois émise que cette protéine cristallisée est une substance chimiquement homogène n'est peut-être pas exacte, comme nous le verrons au cours de ce mémoire.

De nombreuses recherches ont été également entreprises pour savoir s'il existe dans l'insuline des "fonctions ou groupements spécifiques" particulièrement responsables de son activité pharmacodynamique. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de localiser de tels groupements. Les points particulièrement sensibles de la molécule ($-NH_2$, $-OH$, $-S-S-$, etc...) sont les mêmes que pour d'autres produits biologiquement actifs; et il semble

que la structure elle-même de la molécule ait un rôle fondamental.

D'après l'étude de ses produits d'hydrolyse, il paraît peu probable que l'insuline contienne dans sa molécule d'autres substances que les composants habituels des protéines.

Par contre, si, jusqu'à présent, tous les essais ont été infructueux qui tendent à isoler un groupement prosthétique, on ne peut pas rejeter pour autant la possibilité d'existence d'un tel groupement. Celui-ci peut très bien devenir inactif dès qu'on le sépare du reste de la molécule.

Dans cet ordre d'idées, les travaux de DINGEMANSE ⁽⁹⁶⁾ et de ses collaborateurs et partisans pouvaient avoir une importance considérable. Ces auteurs ont en effet publié avoir obtenu des insulines titrant jusqu'à 300 unités au milligramme, ce qui militait en faveur d'un groupement prosthétique actif couplé avec une protéine inactive.

Mais ces travaux ont été très critiqués et n'ont pas pu être vérifiés par d'autres travailleurs, même en utilisant les produits et la technique fournis par DINGEMANSE. Il semble qu'il faille prendre ces résultats avec circonspection.

Il était donc généralement admis que l'insuline cristallisée, substance homogène, titrait 22 u.i./mg.

Cependant, depuis la constitution d'un étalon international et la standardisation des méthodes de titrage, quelques auteurs avaient déjà remarqué que l'activité des préparations cristallisées pouvait varier de quelques unités au milligramme.

Deux hypothèses étaient possibles pour expliquer ce phénomène :

- une modification de structure au cours de la préparation telle que la racémisation d'un centre asymétrique,
- la syncristallisation de deux substances d'activités différentes.

Pour notre part, nous avons réussi à isoler des eaux-mères de cristallisation des cristaux particulièrement actifs. L'étude des propriétés physiques de ce produit plaide plutôt en faveur de la seconde *hypothèse*

Les résultats que nous allons exposer portent sur l'activité hypoglycémiant, la teneur en azote, la forme cristalline et les propriétés physiques suivantes : diffraction aux rayons X, absorption dans l'U.V. et dans l'I.R.

RECHERCHES PERSONNELLES

I.- ISOLEMENT DE CRISTAUX A ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE VARIABLE.

Au cours de la préparation d'un stock d'insuline cristallisée destinée à la constitution d'un étalon national (1941-1943) nous avons eu la possibilité de travailler sur des lots importants de cristaux, provenant de sources variées : pancréas de boeuf, de veau, de cheval.

Nous avons mené les cristallisations par une méthode dérivée de celle de SCOTT.

L'homogénéité des cristaux était obtenue par cristallisations répétées et centrifugations fractionnées jusqu'à activité constante. Elle était vérifiée, en même temps que l'absence de toute gangue amorphe, par examen microscopique.

Au bout d'un nombre d'opérations variables, l'activité s'est stabilisée à 22-23 unités au milligramme, mesurée par l'action hypoglycémiant sur le lapin standard (méthode croisée Codex).

Mais l'examen méthodique des eaux-mères de cristallisation, laissées à la chambre froide à + 5° C, nous a permis de récolter au bout de 8 à 15 jours de séjour à cette température, de très petites quantités de cristaux (de 10 à 50 mg) en apparence identiques aux premiers.

Ces cristaux, titrés dans les mêmes conditions, et comparativement aux premiers, nous ont donné des chiffres de l'ordre de 30 unités au milligramme, s'écartant de façon significative de celui de 22, eu égard à la précision de la méthode utilisée (5 à 10 %).

Ces deux séries de cristaux font l'objet de l'étude exposée plus loin. Nous les appelons Cristaux A (22 u.i./mg) et B (30 u.i./mg.).

II.- ETUDE COMPARATIVE DES CRISTAUX A et DES CRISTAUX B.

1°/ - Teneur en azote des deux lots de cristaux :

La faible provision des cristaux B ne nous a permis de titrer que l'azote total.

.../...

Technique : Technique de Kjeldahl. Microméthode portant sur 10 mg. de cristaux desséchés sous-vide phosphorique à poids constant.

- catalyseur : mélange de SO_4K_2 ^(partiel) et de sélénium en poudre ^(d'atm)
- indicateur : alizarine sulfoconjuguée
- liqueurs : SO_4H_2 et NaOH N/50

Résultats : Cristaux A : 14,5-14,6-14,8 %

Cristaux B : 13,02 - 13,1 - 12,2 %

Par conséquent la teneur en azote total de ces deux lots de cristaux est différente. Il faut d'ailleurs remarquer que la teneur des cristaux A est voisine de celles qui sont données dans la littérature (14,03 et 14,49 HARRINGTON et SCOTT, 15,69 JENSEN-WINTERSTEINER et GEILING 15,4 ABEL). En revanche les cristaux B ont une teneur plus faible.

2°/ - Examen microscopique des formes cristallines des cristaux A et B :

Généralités :

D'après la littérature, les cristaux d'insuline peuvent se classer en deux groupes - cristaux à caractère rhomboédrique, biréfringents

- 7 en "aiguilles", en "coins", en "dents de chien" peu biréfringents.

En particulier SCOTT a observé les premiers en travaillant à pH 6.2 et les seconds à pH 5,2.

Je ne pense pas pour ma part que le pH soit le facteur essentiel du choix par l'insuline de sa forme cristalline.

J'ai pu observer des formes en "coins" entre pH 5,9 et 6,5 et inversement des rhomboèdres au-dessous de 5,3.

Un facteur très important qui détermine la forme cristalline de l'insuline est la présence de protéines très voisines qui modifient le milieu de cristallisation au point de vue physico-chimique.

Tout semble se passer comme si la forme normale était le rhomboèdre. Mais si les conditions de cristallisation sont mauvaises (pH bas et surtout présence d'impuretés) elles empêchent le plein épanouissement du rhomboèdre, riche en éléments de symétrie et ne laissent subsister que des formes pauvres en éléments de symétrie.

Examen microscopique :

Les deux lots de cristaux ont été examinés aux microscopes normal et polarisant.

Aucune différence n'a pu être notée. C'est toujours la même association de deux rhomboèdres surbaissés, de tailles identique ou différente.

L'association des deux rhomboèdres jumeaux se fait suivant l'axe de symétrie ternaire. Le décalage est normalement de faible amplitude et se confond à cause des manifestations colorées des interférences.

Dans certains milieux très visqueux, le décalage est plus grand et le cristal peut alors basculer et tenir en équilibre sur une partie de l'"hexagone en zig-zag" qu'il dévoile ainsi (Voir fig.).

3°/ - Diagrammes de diffraction aux rayons X :

Généralités :

Les premiers essais d'investigation de la structure de l'insuline cristallisée par les rayons X (GEORGE 1928 - FREUDENBERG 1930 - SCOTT 1930) ont été infructueux.

Pourtant en 1932, CLARK et CORRIGAN obtenaient des résultats positifs. Ils décrivaient une maille monoclinique formée de 26 molécules.

Enfin à partir de 1935, Miss CROOFOOT opérant sur un seul cristal montre que la maille du cristal insulinique est rhomboédrique. Elle la décrit comme étant constituée par une seule molécule et en donne les paramètres et l'angle α ($a = 44.3 \text{ \AA}$ - $\alpha = 115^\circ$).

Diagrammes aux rayons X :

N'ayant pu obtenir les moyens techniques pour expérimenter sur un cristal unique, nous avons utilisé la méthode des poudres, technique de DEBYE et SHERRER.

Voici les caractéristiques de l'appareillage utilisé :

- Appareil Métalix travaillant sous 24 kv et 20 mA
- Anticathode de cuivre
- filtre de nickel
- temps de pose : 2 heures.

Pour éviter la présence des raies parasites les produits sont placés sous tube de collodion.

Nous donnons ci-dessous le meilleur cliché que nous ayons pu obtenir. Il correspond à A. Les autres sont semblables et il est visible que la comparaison est très difficile. Aucun élément d'information sérieux ne peut en être obtenu.

Le diagramme se présente avec deux anneaux diffus. Cet aspect se retrouve avec certains verres sur le point de se dévitrifier ce qui a fait penser à un début d'orientation organisée. Et pourtant, que de magnifiques cristaux et surtout quelle constance admirable non seulement dans la forme mais aussi dans la taille. Il est évident que l'organisation structurale de ces cristaux est extrêmement complexe. Les différents constituants protidiques ont une influence sur l'orientation des atomes. Ainsi, CROWFOOT suppose que la présence de protéine amorphe au sein du cristal peut amener celui-ci à prendre la forme prismatique. c'est également notre avis, car nous avons vu de nombreuses préparations insuffisamment pures nous donner des cristaux prismatiques alors que les plus pures donnent toujours des cristaux rhomboédriques. L'eau peut aussi avoir une influence considérable : non seulement l'eau de cristallisation qu'une dessiccation suffisamment poussée peut faire perdre, mais peut-être de l'eau sous une autre forme, moins connue (eau liée ?).

Il est probable, en tout cas, que ces composés annexes sont responsables des "flous" des diagrammes. Des perfectionnements techniques projetés nous permettront peut-être d'obtenir des figures plus lisibles.

4°/ - Spectres d'absorption dans l'Ultra-Violet :

Généralités :

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet présente une bande dite "des protéines" à 276 m μ (GAUBNER, HUHN, SIMS)

Spectres U.V. des cristaux A et B :

Nous nous sommes bornés à examiner la zone du maximum.

L'appareil utilisé est un spectrographe

Aucune différence, ni dans la portion du maximum, ni dans la valeur de l'absorption n'a pu être décelée (Voir Fig.).

50 - Spectres d'absorption dans l'infrarouge :

A ma connaissance ce spectre n'a pas été fait. (x)

L'étude a pu être réalisée au laboratoire de recherches physiques de la Sorbonne grâce à l'obligeance de Monsieur le Professeur Lecomte qui a bien voulu me faire bénéficier de sa haute compétence et de sa notoriété dans ce domaine. Sa technique est décrite dans

Résultats :

Le spectre des cristaux A présente 3 bandes : 9,68 μ - 8,16 μ et 6,43 μ . La première et la troisième sont les plus marquées. Au delà de 11 μ le spectre est constitué par un contrefort plus ou moins régulier. En deça de 6 μ , l'appareil atteint sa limite de dispersion.

Le spectre des cristaux B est essentiellement différent en ce sens qu'il a perdu la bande à 9,68 et que celle de 8,05 μ est à peine apparente. Seule celle à 6,43 μ est toujours bien marquée.

III. - DISCUSSION

D'après les activités physiologiques les spectres d'absorption I.R. et les titres en azote, on peut conclure que les cristaux A et B sont bien des individus différents.

Il est permis de penser que les cristaux B ont perdu, par rapport aux cristaux A une ou plusieurs substances riches en azote que l'inuline et beaucoup moins active physiologiquement.

La bande à 6,43 μ semble bien appartenir à l'hormone. Il serait intéressant de pouvoir étudier la zone du spectre qui va de 6 à 1 μ . Des perfectionnements en cours nous le permettront peut-être.

Pour ce qui est des spectres U.V., il n'est pas étonnant qu'ils soient comparables. Le spectre U.V. est le reflet des gros groupements moléculaires. La bande à 276 $m\mu$, "bande des protéines" n'a aucune spécificité. Les attributions aux groupements benzéniques des acides aminés cycliques. En tous cas la perte d'une substance de type protéique n'affecte pas en définitive le spectre des cristaux B.

Par contre la "disséction moléculaire" que constitue le

(x) Depuis des travaux américains sont parus sur cette question.

spectre I.R. est beaucoup plus fine. Chaque acide aminé s'individualise car ce sont ses groupements fonctionnels qui sont chromophores. Il n'est pas étonnant que ce soit dans ce domaine que nous trouvions des différences entre A et B. De même l'identité des formes cristallines n'a pas à surprendre. Comme pour de nombreux cristaux de protéines, diverses substances protidiques s'associent au sein du même cristal. Nous avons là un exemple de syncrystallisation, phénomène de plus en plus courant dans la chimie des molécules biologiques complexes.

IV .- Conclusions

L'étude systématique des eaux-mères de cristallisation d'insuline a permis d'isoler de faibles quantités de cristaux (B) dont l'activité physiologiques, la teneur en azote et le spectre des rayons I.R. s'écartent nettement des mêmes propriétés de l'insuline cristallisée pure (A).

Ces cristaux B doivent avoir perdu, par rapport aux cristaux A une ou plusieurs substances plus riches en azote mais beaucoup moins actives sur la glycémie, substances vraisemblablement de nature protidique.

Ces substances et l'insuline syncrystallisent en une même forme cristalline.

Ce phénomène repose en fait le problème de l'identité réelle de l'insuline. Le fait de l'obtenir cristallisée ne paraît pas constituer une preuve suffisante de pureté. N'est-ce pas trop audacieux de dire que nous ne connaissons actuellement ni l'activité limite, ni la véritable identité de cette hormone.

ADDENDUM

Depuis ces conclusions, tirées en 1943, des travaux étrangers sont venus apporter un début de confirmation à cette hypothèse.

En effet, SUTHERLAND (E.W.) et CORI (C.F) ont publié en 1948 que certaines préparations d'insuline ^{hautement} purifiées, quelles soient amorphes ou cristallisées renfermaient un principe glycogénolytique. Dans certains cas, suivant le type de cristallisation, ce principe peut-être absent. Ainsi l'insuline cristallisée selon le procédé ABEL n'en renfermerait pas.

Il est très vraisemblable qu'une des substances que nous supposons

manquer aux cristaux B par rapport aux cristaux A puisse être de nouveau principe obligatoirement moins hypoglycémiant puisqu'il est hyperglycémiant.

D'autre part et simultanément, HEARD(R.D.H.), LOZINSKI(E.), STEWART (L) et STEWART(R.D) ont isolé un facteur glycogenolytique et hyperglycémiant du pancréas où il prendrait naissance dans les cellules < des îlots de Langerhans. Il est facile à comprendre que cette substance, de nature vraisemblablement voisine de celle de l'insuline, est difficile à séparer de cette dernière et que dans certains cas elle puisse la suivre jusqu'à la cristallisation.

LA FORME CHIMIQUE DE L'INSULINE (CRISTAUX et CHLORHYDRATE) A-T-ELLE
UNE INFLUENCE SUR SON ACTIVITE "CONVULSIVANTE"

Dans cette étude, nous avons comparé l'influence de la forme chimique de l'insuline sur l'apparition et la fréquence des crises convulsivantes chez le Rat blanc. Nous avons utilisé pour cela de l'insuline cristallisée et du chlorhydrate d'insuline, deux produits titrés préalablement par la méthode classique officielle (glycémie du Lavin).

Pour arriver à des résultats valables, il nous a fallu utiliser un nombre assez important d'animaux et surtout faire appel aux méthodes statistiques modernes. En fait, c'est une véritable méthode de titrage que nous avons abouti.

Dans l'exposé, nous avons fait précéder nos expériences, des généralités qui nous ont dirigé dans ce travail.

~~Les notions modernes sur la question fondamentale des titrages biologiques sont dispersées dans la littérature, principalement étrangère : ainsi par exemple, la description des méthodes statistiques. En général, ces questions sont ardues, d'autant plus qu'elles sont exposées dans une langue qui n'est pas la nôtre.~~

~~Il ne faut pas s'abuser sur l'infailibilité des formules mathématiques qui encombrant ces mémoires. Cependant, il faut concéder qu'elles rendent de grands services, à condition de ne jamais perdre de vue leur caractère arbitraire de "rigidité".~~

. . .

- A -

GENERALITES

Dans l'établissement d'un titrage biologique, il importe de procéder méthodiquement et de ne pas oublier certains principes fondamentaux.

On compare souvent un tel titrage à une pesée ou l'animal serait une balance à bras variables. Tout vient compliquer la "pesée". Alors que la position, sur les plateaux d'une balance, des poids et du corps à peser sont sans effet sur la précision de la pesée, il faut, dans le cas de "l'animal-balance" définir soigneusement l'état physico-chimique, le point d'attaque, le mode d'action, etc... de l'étalon et de la substance à titrer.

Ici les influences extérieures ont une très grande importance.

Enfin, il n'est pas souvent possible, comme c'est le cas de la balance, d'augmenter la sensibilité de l'animal.

Une bonne précision sera le reflet de la conjonction favorable d'une sensibilité optimum et d'une fidélité maximum, deux qualités qu'il faudra auparavant étudier et définir soigneusement.

I - CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'ANIMAL. - Il est évident que le plus grand soin doit présider au choix de "l'animal-balance". Celui-ci doit remplir un certain nombre de conditions sans lesquelles l'expérimentateur risque d'aller au devant d'erreurs, d'autant plus nuisibles qu'elles seront inconnues.

Ce choix est défini et limité par deux conditions. La première est d'ordre technique et échappe en partie à notre volonté : elle est fonction du phénomène biologique de base. L'animal devra donner la réaction physiologique étudiée, avec une sensibilité maximum compatible avec une fidélité excellente. Cette réaction devra se rapprocher le plus possible de la réaction humaine si la substance est étudiée en vue de la thérapeutique.

La deuxième est d'ordre pratique : elle tient surtout à la plus ou moins grande facilité de manipuler et de se procurer l'animal en question.

Par exemple, si la mesure du phénomène requiert une prise de sang, il est superflu de dire qu'il faut la pratiquer sur un animal tel que le prélèvement du volume de sang nécessaire ne soit pas dangereux ou seulement susceptible d'agir sur le phénomène étudié.

On sait d'autre part, que la plupart des titrages biologiques n'ont de valeur que s'ils sont pratiqués sur un nombre d'animaux assez important. Il est malheureusement difficile, sinon impossible, de se procurer sur le marché français des lots importants de bêtes "standard" car l'élevage de ces animaux en France, n'a ni l'ampleur ni l'organisation que l'on trouve à l'étranger. Force est donc d'employer des lots restreints. Dans ce cas, il importe plus que jamais de veiller sur l'état physique et physiologique des bêtes.

Il est prudent qu'elles soient de même souche, en bonne santé ; qu'elles possèdent bien les caractères morphologiques de leur âge, sexe, race, etc...

~~Combien d'erreurs, de divergences dans les résultats publiés viennent de ce que certains Auteurs emploient des animaux disparates, ni choisis, ce qui est parfois difficile, ni définis, ce qui est toujours possible.~~

~~Nous avons pu déjà, au cours d'essais de toxicité, nous rendre compte de l'extrême diversité des animaux achetés dans le commerce ; nous n'avions réussi, à l'époque, qu'à nous procurer des lots de souris de souches variées, ayant pour un même poids des âges divers et mal connus et contenant une forte proportion d'animaux parasités. Les résultats obtenus dans ces conditions ont beaucoup moins de valeur que ceux obtenus sur des lots plus faibles de bêtes en parfait état et "standardisées".~~

L'EXPERIENCE. - Le choix des conditions expérimentales est soumis aux mêmes règles que celui de l'animal.

De plus, il est préférable que ces conditions soient facilement réalisables. Plus elles seront simples, plus elles seront faciles à respecter et plus les résultats auront de chances d'être réguliers.

Pour les déterminer, on fait varier un facteur, en maintenant tous les autres constants, et on étudie l'influence de cette variation sur l'ampleur et la fidélité du phénomène.

Ces essais peuvent être assez grossiers et n'utiliser que des nombres peu élevés d'animaux. Ils doivent être précédés par l'observation et la description du phénomène biologique utilisé comme base.

II - ETUDE DU PHENOMENE BIOLOGIQUE DE BASE.

Etablissement de la relation unissant l'effet
et la dose

Dans tout titrage biologique, cette étude est fondamentale. C'est en effet sur la relation unissant l'action étudiée et la dose, que reposent la comparaison de deux produits et l'estimation de l'activité d'une préparation inconnue.

On sait que l'on peut classer les titrages en plusieurs groupes dont les principaux sont :

I - Ceux dans lesquels la réponse physiologique de base varie de façon continue avec la dose. Cette réponse peut-être mesurée directement sur un individu isolé et chaque mesure est valable par elle-même.

C'est le cas, par exemple, de la diminution de poids corporel d'un cobaye sous l'action de la thyroxine.

Dans ces titrages, lorsqu'on emploie un groupe d'animaux recevant la même dose, la réponse est la moyenne des réponses individuelles.

2 - Ceux dans lesquels la réponse est dite du "Tout ou rien". C'est le cas où le phénomène se termine, par exemple, par la mort de l'animal. Il est souvent très difficile de mesurer directement la dose minimum provoquant le phénomène en cause. On emploie alors un lot d'animaux auxquels on injecte une même dose. La réponse devient ici le pourcentage d'animaux présentant le symptôme choisi. Exemple : la détermination de la toxicité d'un insecticide.

C'est dans ce deuxième cas que se place le titrage de l'insuline, par la méthode des convulsions. Aussi devons nous exposer succinctement les idées théoriques fondamentales avant de passer, au chapitre B, à l'application pratique de ces idées.

Quand on administre à une série de lots d'animaux des doses croissantes d'un produit déterminé, si on prend comme ordonnées les % d'animaux affectés et comme abscisses les doses,

44

on obtient une courbe, dont la forme est celle d'un S dissymétrique, (ou ~~à la forme d'un~~ ^{à la forme d'un} courbe sigmoïde).

Cette courbe peut être considérée, dans sa région moyenne et sur un faible parcours, comme une droite, c'est-à-dire que l'accroissement d'effet est proportionnel à l'accroissement de dose.

C'est en général cette région qui est utilisée dans les titrages à cause des avantages de la ligne droite pour les calculs.

En fait, cette ^{portion de courbe} ~~qualité linéaire~~ n'est qu'approximativement ^{linéaire} linéaire : on a souvent intérêt à transformer la courbe sigmoïde en droite, par le choix convenable des échelles. C'est ainsi qu'en prenant comme abscisses, non plus les doses, mais les log. des doses (ou en utilisant du papier semilogarithmique) on obtient une courbe plus étirée, dont la portion sensiblement linéaire est très agrandie. Nous verrons plus loin que certains Auteurs considèrent cette nouvelle courbe comme l'intégrale de la courbe de fréquence des sensibilités individuelles.

Il existe d'autres méthodes, en particulier celle imaginée par GADDUM et étudiée par divers statisticiens et biologistes tels que BLISS, FISCHER, HEMMINGSEN (13-10-14-15-16-17).

Comme nous nous basons sur elle dans la partie expérimentale (chapitre B) nous la résumerons brièvement.

On sait que les "doses minima effectives" (D.M.E.) - c'est-à-dire les plus petites doses provoquant l'effet cherché - se répartissent expérimentalement, dans une population d'individus, suivant une courbe de fréquence dite " courbe en cloche", à cause de sa forme. Cette courbe peut être symétrique ou non. Dans le premier cas, on dit que les D.M.E. sont " distribuées ou réparties normalement".

Pour l'insuline et la souris, HEMMINGSEN a démontré, au cours d'expériences totalisant jusqu'à dix mille animaux par point, que les log. des doses convulsivantes individuelles (ou sensibilités individuelles) sont normalement distribués. Il obtient d'ailleurs ce résultat indirectement.

Voici son hypothèse de départ : " la courbe de fréquence" des doses convulsivantes individuelles (c'est-à-dire des D.M.E.) peut être connue indirectement grâce à la relation unissant la dose et les % d'animaux affectés, car cette relation doit représenter l'intégrale de fréquence des sensibilités individuelles.

Il établit alors sur des lots considérables d'animaux, la courbe % convulsions/ log. des doses.

Ici intervient un raisonnement mathématique qui, en langage simple peut s'énoncer comme suit :

Si la courbe expérimentale % convulsions/ log. doses, a la même expression mathématique que l'intégrale de fréquence normale, pour une même échelle d'ordonnées, les valeurs d'abscisses de ces deux courbes - expérimentale et théorique - sont dans un rapport constant.

Autrement dit, la relation unissant les log. des doses et les écarts normaux est linéaire si la courbe expérimentale ci-dessus a la même expression que la courbe de fréquence normale. Dans ce cas la courbe de fréquence des sensibilités individuelles est normale.

Les écarts normaux correspondant aux % d'animaux affectés sont appelés " écarts équivalents normaux"(E.E.N.)

Si la courbe E.E.N./log. des doses n'est pas une droite, c'est que la courbe de fréquence des sensibilités individuelles n'est pas normale.

46

Or, HEMMINGSEN, d'après ses très nombreux résultats et l'examen de ceux d'autres Auteurs arrive à la conclusion que les log. des doses convulsivantes individuelles sont réparties normalement.

Il est évident que les chiffres expérimentaux (en E.E.N./log. des doses) ne se disposent pas sur une ligne droite absolument parfaite. Comme dans tout tracé graphique, on fait passer " mécaniquement" par les points, la ligne la plus probable, dont la position est vérifiée par la méthode des moindres carrés.

Tous ces calculs et traitements mathématiques sont ardues. Heureusement les statisticiens biologistes ont partiellement simplifié ces méthodes par l'usage de tables. En particulier BLISS a publié des articles donnant la conversion des % en écarts. De plus, pour éviter les valeurs négatives gênantes dans les calculs, il assigne à l'écart 0 la valeur 5. Ces nouveaux écarts sont baptisés " Probits" (" Probability-units"). Il y donne aussi une méthode rapide pour vérifier la position correcte de la droite probits/ log. des doses par un système de pondération spécial.

III - COMPARAISON DE DEUX PRODUITS.-

Titrage de l'activité d'une préparation inconnue.

Quand on a fixé les conditions expérimentales et établi la relation Effet/Dose, il reste à étudier les différents moyens de comparaison de deux activités différentes et de titrage d'une préparation d'activité inconnue.

Voyons d'abord les principales variations de sensibilité des animaux qui peuvent intervenir lors d'un titrage et fausser les résultats. On peut les classer comme suit :

I - Variations persistantes entre différentes populations d'individus.

2 - Variations temporaires dans une même popula-

tion, c'est-à-dire variations de la réponse moyenne en fonction du temps. 47

3 - Variations persistantes entre différents individus, c'est-à-dire différence des sensibilités individuelles.

4 - Variations temporaires individuelles.

L'expérience nous montre, seule, l'ordre de grandeur de chacune de ces variations. On peut d'ailleurs éliminer, en grande partie, leur influence sur les résultats.

Pour neutraliser les premières, on se rapporte à un produit d'activité connue et stable, c'est-à-dire à un étalon. On compare dans les mêmes conditions expérimentales, l'action de l'étalon et celle de la préparation inconnue.

Pour éviter les deuxièmes, il faut, de façon absolue, pratiquer les essais de l'étalon et de la préparation en même temps.

Les troisièmes sont compensées automatiquement par l'emploi d'un grand nombre d'animaux et en utilisant successivement les mêmes individus pour l'étalon et pour la préparation inconnue. C'est le principe de "l'essai croisé". Mais alors on introduit les variations temporaires individuelles. Pour les éliminer, on peut répéter les mesures et faire des moyennes.

Ayant ainsi compensé au maximum les principales variations de sensibilité, causes d'erreurs, nous pouvons comparer les résultats des deux préparations. Différentes méthodes s'offrent à nous.

I - La Courbe " caractéristique " Effet/Dose
est connue.

Il suffit de rapporter à cette caractéristique déterminée d'avance sur des lots importants d'animaux, les deux résultats donnés pour la même dose, par l'étalon et l'inconnue, le même jour.

Le rapport des valeurs d'abscisses obtenues par le rabattement, sur la caractéristique, des ordonnées étalon et inconnue nous permet de calculer l'activité de la préparation inconnue.

II - La caractéristique est inconnue.

a) On peut construire pour chaque produit une courbe Effet/Dose et les comparer.

On utilise suivant le cas :

- La courbe % animaux affectés/Dose
- La droite % animaux affectés/log.doses
- La droite E.E.N. ou probits/log.doses.

Dans le premier cas le rapport, dans les deux autres l'écart logarithmique entre les deux courbes, mesurent la différence d'activité entre étalon et inconnue.

b) Au lieu de construire les courbes, on peut, pour diminuer les essais et éliminer le facteur personnel lors du tracé des droites E.E.N./log.doses, calculer leur pente. (Elles sont parallèles dans le cas de l'insuline). Pour cela il suffit de deux doses pour chaque préparation, ou même d'une seule si l'on fait deux hypothèses encadrant l'activité supposée.

III - S'il n'est pas possible de construire de caractéristique ni de courbe Effet/Dose, on peut quand même arriver à comparer deux produits, en définissant deux activités identiques comme étant celles qui provoquent le même effet, dans les mêmes conditions expérimentales.

PRECISION - ERREURS :

La précision s'exprime généralement par les moyens classiques. Toutefois l'application du calcul des probabilités aux résultats expérimentaux (biologiques ou autres) base de ces moyens, est très ^{delicate} critique. Quoiqu'il en soit, Il faut être très prudent dans leur maniment, et il ne faut pas oublier qu'ils

ne sont que le reflet de la régularité des résultats. (Ils ne tiennent pas compte, par exemple, des erreurs systématiques).

{ Erreur moyenne d'une expérience isolée : $\sqrt{\frac{\sum d^2}{n}} = \sigma^{(1)}$

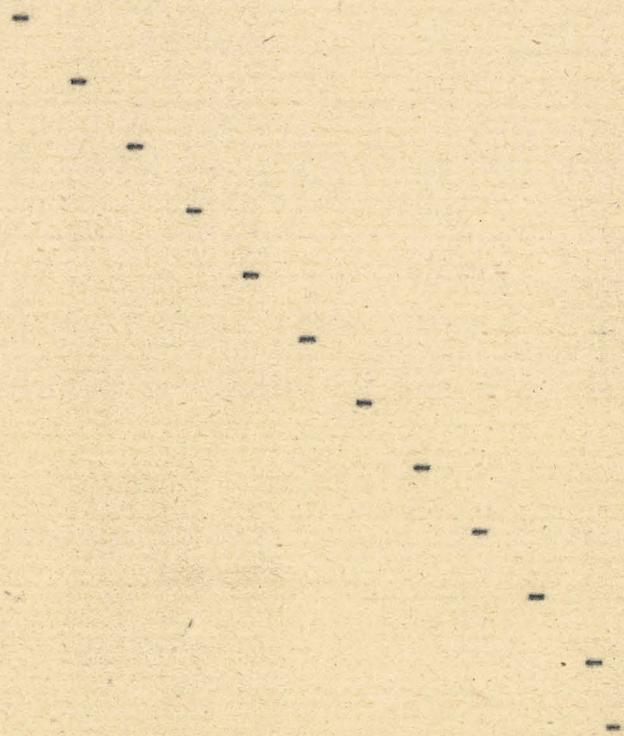
{ Erreur moyenne d'une série de N expériences : $\frac{\sqrt{\sum d^2}}{\sqrt{N}}$

{ Erreur probable d'une expérience : $0,6745\sigma$

{ Erreur probable d'une série de N expériences : $0,6745\frac{\sigma}{\sqrt{N}}$

Le degré de confiance que l'on peut avoir en une moyenne peut être augmenté quand on encadre cette moyenne par un certain nombre de fois σ (\pm). On a ainsi une zone. La probabilité qu'a la valeur réelle, de se trouver dans cette zone donne une idée de la confiance à attacher au groupe d'essais. Des Auteurs l'ont calculée en fonction de σ ; voici quelques valeurs :

Nombre de	:	± 1	± 2	± 3	± 4
Probabilité :		2/3	21/22	333/334	5000/5001



(1) correspond à "Standard déviation" = S.D.=

TITRAGE DE L'INSULINE SUR LE RAT

Etablissement du Test

I - L'ANIMAL

Pour l'étude de l'action convulsivante de l'insuline cristallisée et du chlorhydrate d'insuline, nous avons le choix entre le lapin, le cobaye, le rat, la souris. Pour les raisons indiquées plus haut, nous avons choisi le rat albinos, bien que la souris soit utilisée couramment à l'étranger et que nous aurions pu bénéficier d'un titrage mis au point et ayant fait ses preuves.

Le rat albinos est un animal robuste, ~~≠~~ plus résistant que la souris aux infections microbiennes et parasitaires et qui montre généralement une grande régularité dans ses réactions physiologiques.

Proposé en 1923 par VOEGTLIN (28) dans un test basé sur la toxicité de l'insuline (Recherche de la dose minimum mortelle) HRUBETZ (18) - (1934) lui reprochait sa grande résistance vis à vis de l'action convulsivante de l'insuline.

Dans les conditions bien définies où nous l'avons employé, il s'est révélé suffisamment sensible et fidèle.

II - LES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Définition du phénomène biologique de base : " Les convulsions ".

Les phénomènes nerveux et musculaires déclenchés par une injection suffisamment forte d'insuline sont assez variés.

D'une manière générale, le rat entre dans un état de somnolence marquée qui s'accompagne parfois de paralysie partielle ou généralisée, d'exophtalmie, de quelques mouvements convulsifs de tout le corps.

La prostration s'interrompt souvent brusquement par de violentes convulsions qui font tourner l'animal sur lui-même : il fait ce que nous appelons " le tonneau", ou bien, couché sur le flanc, il exécute de ses quatre pattes des mouvements de "course".

Ou encore, l'animal entre dans un coma profond, devient insensible ; sa respiration est très ralentie, superficielle. Enfin la somnolence peut regresser et l'animal reprendre une allure normale sans le secours d'une injection intra-péritonéale de 3 cc. de glucose à 30 %. Cette précaution est par contre absolument indispensable pour relever les rats de l'état de paralyse, de convulsions ou de coma, phénomènes que nous désignerons par le terme général de "convulsions."

Etude systématique des conditions expérimentales.

Cette étude est précédée par un essai "d'approche" destiné à reconnaître la zone d'action de l'insuline.

Pour cela nous injectons à une série de lots de rats maintenus dans des conditions rigoureusement identiques et constantes des doses croissantes d'insuline. Celles-ci doivent couvrir une plage assez étendue - Elles sont réparties comme suit :

1/8 unité internationale - 1/4 u.i. - 1/2 u.i. - 1 u.i.

L'insuline est une solution d'étalon L.N.C.1940 (Laboratoire national de contrôle) titrant 22 u.i. par mg. Le titre de la solution est de 1 u.i. par cc. d'eau acidulée (HCl 0,02 N) On emploie des lots de 9 rats femelles à jeun depuis 24 heures et maintenus depuis ce temps et pendant l'expérience à une température de 24°C.

Les résultats sont les suivants :

1/8 u.i.	1/4 u.i.	1/2 u.i.	1 u.i.
0 %	11 %	33 %	66 % de convulsions

critique h.

On fait alors toute une série d'essais comparatifs dans des conditions bien définies et constantes dans chaque essai. Toutefois pour éviter un trop grand nombre de combinaisons, toute "condition" étudiée et choisie est considérée comme acquise pour l'essai suivant.

Par mesure d'économie, le nombre de rats par lot est restreint ; deux résultats sont estimés différents s'ils s'écartent l'un de l'autre d'une valeur vraiment significative.

L'insuline utilisée est d'activité moyenne (16,6 u.i./m.g.)

Dans les essais 1,2,3,4,5, la solution contient 2 u.i. par cc. et le volume injecté est de 0 cc. 5 (= 1 u.i.)

(Tableau I p.)

Conclusions.-

L'examen du tableau I nous montre que la sensibilité croît avec la température ambiante,

- la durée du jeûne,
- et* la concentration de la solution.

Les différents modes d'injection nous ont donné, sur de petits lots, il est vrai, des résultats identiques, sauf pour l'injection intra-musculaire.

Dans ce cas, il faut cependant noter des causes possibles d'erreur : 0 cc.5 représente un volume important si on le compare à celui de la patte dans laquelle on l'injecte et il se peut qu'une partie de la solution soit refoulée par la contraction des muscles. Il est possible également que la dégradation de l'insuline soit plus active au niveau du tissu musculaire.

Ces essais ne nous permettent pas d'affirmer une différence de sensibilité entre mâles et femelles ; mais la suite du travail nous a montré une résistance plus marquée du côté des

TABEAU I

Conditions expérimentales		Nombre total d'animaux	Nombre de convulsions	Pourcentage
JEUNE	{ de 2 heures	12	6	50
	{ de 5 heures	12	7	58
	{ de 23 heures	12	9	75
<hr/>				
TEMPERATURE AMBIANTE	(10°)	18	7	38
	(23°)	18	12	66
<hr/>				
MODALITÉ D'INJECTION	(Sous cutanée.	9	8	88
	{ Intra-péritonéale.....	9	7	77
	{ Intra-veineuse (v. Jugulaire).....	6	4	66
	{ Intra-musculaire.....	9	2	22
<hr/>				
Poids et Sexe	{ ♂ de 50 à 100 Gr.	10	2	20
	{ ♀ de 50 à 100 gr.	10	1	10
	{ ♂ de 100 à 150 gr.	10	0	0
	{ ♀ de 100 à 150 gr.	10	0	0
<hr/>				
Quantité de sérum	{ HCl 0,02 N	8	2	25
	{ HCl 0,1 N	8	2	25
	{ HCl 0,02 N + 7% ^u NaCl	8	5	62
	{ HCl 0,02 N + 47 % ^u glucose	8	2	25
<hr/>				
Dose de sérum	(I ui dans Occ, 1	11	10	90
	(I ui dans Occ, 2	11	9	81
	(I ui dans I cc.	11	5	45

mâles.

Enfin le test n°5 (voir tableau I) est en accord avec l'observation de MARKS (22) faite à l'occasion du titrage de l'étalon international en 1956.

Nous pouvons, dès maintenant, et en nous inspirant des idées générales énoncées plus haut, résumer les conditions expérimentales favorables comme suit :

- Facteurs se rapportant à l'animal :

Rats mâles ou femelles,
Poids : 100 à 200 gr.
Jeûne : 20 heures.

- Facteurs se rapportant à l'expérimentation :

Température ambiante : 24 ° C.
Mode d'injection : Sous-cutanée.
Solvant : Eau acidulée (HCl 0,02 N).
Concentration : Iui dans 0 cc.2

Les animaux sont placés dans une salle isotherme à 24° C. et mis à jeun 20 heures avant le début du test. Celui-ci dans son entier, a lieu dans la même pièce, ce qui favorise beaucoup la manipulation.

III - ETABLISSEMENT DE LA RELATION % CONVULSIONS/DOSES

Cette série d'essais, qui a pour but d'obtenir une courbe % convulsions/doses sera poursuivie dans les conditions expérimentales définies précédemment.

Comme nous ne disposons que d'un nombre d'animaux peu élevé, nous les divisons en 4 lots de 10 rats homogènes (lot I et lot II Série A - Lot I et Lot II Série B) et en réservant un certain stock pour remplacer au fur et à mesure les animaux morts ou en mauvais état.

Le produit utilisé est une solution, dans l'eau acide (HCl 0,02 N) d'insuline de pureté moyenne et telle que 1 u.i. soit contenue dans 0 cc.2 On ajoute 1 % d'antiseptique et on conserve le produit à + 5°C.

Celui-ci est administré en doses croissantes : 0,125 u.i. - 0,25 u.i. - 0,375 u.i. - 0,5 u.i. - 0,625 u.i. - 1 u.i. - 1,5 u.i. - 2 u.i. - 2,5 u.i. Chaque dose est injectée successivement et à intervalles réguliers à chacun des lots. Ainsi, les moyennes des résultats par dose seront en grande partie soustraites à l'influence des variations éventuelles de sensibilité.

En règle générale, les animaux servent une seule fois par semaine.

On arrête les essais au bout de 3 mois : les résultats portent alors sur un ensemble de 40 "mesures individuelles". Les pourcentages de convulsions sont rassemblés dans le tableau II

TABLEAU II

Ligne	SERIE "A"		SERIE "B"		SERIE A	SERIE B	Moyennes Générales
	Lot I	Lot II	Lot I	Lot II	Moyennes horizontales		
a.i ui)	0	0			0		0
ui. ui)			10	0		5	5
ui 2 ui.)	40 0	33 0	30 40	60 50	36 0	45 45	31
i. ui.)	50 90	30 60	10	0	40 75	5	40
i. ui.)	80 90	30 90	20 60	60 40	55 90	40 50	58
i. .)	80 100	88 60	90 100 100	90 100 90	84 100	90 100 95	90
ui ui)	70	90	90	100	80	95	88
.)			100	100		100	100
ui. ui)	100	90			95		95

-Le nombre indiquent les % de convulsions.-

Les quatre premières colonnes contiennent les réponses par lots de 10 rats, les chiffres placés sur une même horizontale ayant été notés le même jour. Rappelons que dans l'ensemble, pour une même dose les essais ont été répartis régulièrement dans le temps qu'a duré l'expérience.

Les cinquième et sixième colonnes groupent les moyennes horizontales dans chaque série, soit sur des lots de 20 rats. La septième contient les moyennes générales.

Remarque. - Nous notons, en fin d'expérience, un accroissement marqué de résistance dans la série A. Cette variation qui n'est pas compensée par un nombre suffisant d'essais est la cause probable de la faiblesse relative des moyennes générales 88 et 95.

CONCLUSIONS

a) Construction de la courbe % convulsions/doses.

Les moyennes générales (colonne 7) portées en ordonnées contre les doses en abscisses permettent de construire la courbe sigmoïde de la figure I. Cette courbe, si elle n'a pas la prétention d'être une véritable "caractéristique", doit nous en donner cependant une idée proche de la réalité, surtout quant à son allure générale, et ceci est suffisant pour le but proposé.

Elle nous montre, en particulier, que la sensibilité du rat dans les conditions définies plus haut est surtout bonne dans la région 10 % - 80 %.

b) Etude de la dispersion.

Dans la figure 2, nous avons rassemblé les points expérimentaux obtenus sur des lots de 10 rats (petits points). Nous avons également inscrit les résultats donnés au paragraphe II, pour ceux qui ont été obtenus dans des conditions expérimentales sensiblement identiques :

Les □ pour l'essai "d'approche" - étalon LNC

Les + pour les essais numéros 1 (23 h.) - 2 (23°) - 3 (Injec. S.C.) 6 (I u.I. dans 0 cc.2).

L'ensemble de ces points délimite la zone d'action de l'insuline. La dispersion apparait maximum au voisinage de la dose convulsivante 50 % (D.C. 50).

Enfin les grands ronds clairs 0 représentent la dispersion théorique si on la prend égale à 3 fois la "déviatiion standard" (d.s.) Nous avons calculé celle-ci avec la forme donnée par TREVAN d.s. =

$\sqrt{p \cdot q \cdot n}$ ou :

- p = probabilité des convulsions
- q = probabilité des non convulsions
- n = nombre d'animaux employés.

Pour les % pris de 10 en 10 sur la courbe n°I, nous avons :

<u>% convulsions</u>	<u>Dispersion théorique en %</u>
10	± 28,2
20	± 37,8
30	± 43,5
40	± 46,5
50	± 47,4
60	± 46,5
70	± 43,5
80	± 37,8
90	± 28,2

La "dispersion théorique" encadre la dispersion expérimentale, ce qui nous semble être une preuve de régularité.

c) - Choix de la région de la courbe à utiliser :

Les extrémités de la courbe (fig.I) ne nous semblent pas à retenir en vue de l'emploi pour un titrage.

En effet, la sensibilité du rat, représentée par

58

la pente y est faible et ceci n'est pas compensé par une fidélité (inverse de la dispersion) beaucoup plus grande.

En d'autres termes, la précision à attendre est maximum dans la région moyenne car cette précision est fonction non seulement de la dispersion mais aussi de la pente de la courbe.

Graphiquement elle apparaît inversement proportionnelle à la longueur du segment de droite représentant, pour un % donné, l'écart entre les doses limites (fig.3).

D'autre part le bas de la courbe n'est pas utilisable quand on emploie de petits nombres d'animaux par lots.

Enfin pour la partie supérieure, l'expérimentation demanderait une dépense d'insuline importante : et le fait de soumettre les animaux à l'action fréquente de doses presque toujours convulsivantes amènerait des pertes sensibles dans le stock de rats.

d) Nombre d'animaux à utiliser.

L'examen des résultats inscrits au tableau II montre que les moyennes deviennent cohérentes dès qu'elles portent sur 40 rats au moins. Au dessous, la dispersion est grande, la précision faible. Naturellement plus le nombre d'animaux en jeu sera grand et plus les moyennes auront de signification.

~~En France les Chercheurs ne disposent en général que d'un nombre d'animaux restreint.~~

On peut alors, en prenant toutes les précautions utiles pour éliminer ou compenser les variations de sensibilité en fonction du temps (voir p.23) utiliser de petits lots et multiplier les observations sur ces lots.

Les moyennes obtenues sont cohérentes comme l'indiquent les résultats ci-dessus et ci-après :

IV - ESTIMATION DE L'ACTIVITE D'UN PRODUIT D'INCONNU

COMPARAISON DE DEUX PRODUITS.

Il n'est malheureusement pas possible d'utiliser directement la courbe 1 et la zone de dispersion 2 pour le calcul de l'activité d'une préparation donnée. En effet, cette courbe 1 qui doit être le reflet assez exact de la forme de la "caractéristique" représente sa position moyenne pendant la durée de l'expérience, du fait de la répartition des doses dans les lots et dans le temps. La position actuelle étant une inconnue au moment du titrage, nous sommes obligés de recourir à la comparaison entre le produit inconnu et un étalon. La troisième série d'essais que nous allons exposer avait pour but l'étude des divers modes de comparaison et de calcul des activités de deux produits différents.

Les résultats, ainsi que nous le verrons plus loin, nous laissent supposer que la "caractéristique" s'est peu déplacée depuis les premiers essais (il y a 6 mois).

Nous allons comparer la courbe 1, construite de Mars à Mai et la courbe obtenue de Juin à Juillet avec la même préparation d'insuline mais qui, placée dans certaines conditions, a perdu un peu de son activité. Celle-ci est donc inconnue au moment de l'essai. L'expérience terminée et les calculs effectués, elle sera titrée sur le lapin (glycémie) par des expérimentateurs indépendants de nous.

Les deux résultats seront alors confrontés.

a) L'expérience et les résultats :

Seule maintenant, la région moyenne des courbes nous intéresse.

Toujours dans les mêmes conditions expérimentales définies précédemment, la préparation d'insuline "vieillie" est injectée aux doses suivantes : 24 γ , 42 γ , 48 γ , 60 γ

TABLEAU III

Préparation n°1

Préparation n°2 (Préparation "vieillie")

Insuline 1000 ϕ mg.	Nombre de rats	% de Convulsions	Insuline 1/1000 ϕ mg.	Nombre de rats	% de con- vulsions.
0,5.....	20	0			
.....	20	5			
0,5	80	31	24	40	5
.....	60	40	42	80	37,5
0,5	80	58	48	40	50
.....	100	90	60	40	62,5
.....	20	100	72	40	78



Dès que les moyennes portent sur 40 mesures au moins, l'expérience est arrêtée.

Les résultats sont consignés dans le tableau III (colonnes 4,5 et 6). Sont portés également, pour rappel, ceux ayant servi à la construction de la "courbe caractéristique" I.

B) Modes de comparaison - Moyens de calcul :

Les différents modes s'appuient sur deux principes fondamentaux, utilisés d'abord comme hypothèse et vérifiés par la suite expérimentalement sur de très grands nombres d'animaux. (Voir HEMMINGSEN (14) TREVAN et BOOK (27) ~~(Disons tout de suite que les lois biologiques méritent plus que toutes les autres le qualificatif d'approchées. Telles quelles, elles peuvent néanmoins rendre de grands services).~~)

Le premier principe avance que les différentes courbes caractéristiques, représentant la relation % convulsion/dose obtenues avec un même produit, à différentes époques, doivent être de la même forme - mathématique s'entend -. La seule différence est une différence d'échelle d'abscisses, le rapport $\frac{\text{incrément \% d'effet}}{\text{incrément \% de dose}}$ restant constant. Et voici l'interprétation : chaque courbe représenterait la courbe de fréquence intégrée des sensibilités individuelles. Or, les variations en fonction du temps agiraient sur la sensibilité moyenne du stock d'animaux mais non sur la distribution, autour de cette moyenne, des différentes sensibilités individuelles. Le coefficient de variation étant inchangé, l'intégrale de la courbe de fréquence conserve la même forme.

Dès lors, il suffit de déterminer une fois pour toutes la "caractéristique" sur des lots importants d'animaux et d'y rapporter par la suite, les résultats donnés par les deux pré-

parations, le même jour.

Par la suite Hemmingsen montra que c'était non pas la courbe % convulsions/Doses mais la courbe % convulsion/ log. doses qui devait correspondre à l'intégrale de la courbe de fréquence.

À la même époque cet auteur vérifia expérimentalement le deuxième principe : deux produits d'activité différente donnent des courbes % convulsions/doses liées entre elles par un rapport constant : transformées en courbes E.E.N./ log. doses (voir Chapitre A - II p. la définition des E.E.N.) elles sont deux droites parallèles sans que la différence de pureté ait une influence quelconque.

Ces idées fondamentales vont nous donner les moyens de comparer nos deux séries de résultats et d'estimer l'activité de la préparation d'insuline "vieillie".

A - UTILISATION DE LA COURBE % CONVULSIONS/DOSES

Les valeurs du tableau III nous donnent les courbes I et II fig.4.

1°) Méthode de TREVAN.- L'essentiel en a été dit au paragraphe A-III (I) Théoriquement nous ne pouvons l'utiliser ici car la courbe I ne peut pas être considérée comme une "caractéristique" suffisamment précise, le nombre de rats utilisés étant trop faible.

2°) Méthode de HEMMINGSEN.- Si l'on fait le rapport des doses donnant le même pourcentage de convulsions, en interpolant quand il est nécessaire, on a :

15/24 - 22.5/38 - 28/42 - 30/43 - 34/48 - 37.5/56 - 41/60 & 52/72.

c'est-à-dire :

0.62 - 0.59 - 0.66 - 0.69 - 0.70 - 0.67 - 0.68 - 0.72 - dont la moyenne est : 0,66. Notons que ces résultats seraient encore plus

réguliers si nous avons "adouci" les courbes expérimentales.

Les principes énoncés plus haut nous permettent de calculer l'activité de la préparation n°2 : la préparation I faisant 16.6 u.i/ mg., la n°2 fait $16,6 \times 0,66 = \underline{10.9 \text{ u.i./Mg.}}$

B - UTILISATION D'UNE LIGNE DROITE.

I°) Droite % Convulsions/ log. des doses : Si nous prenons comme abcisses les log. des doses et comme ordonnées les % de Convulsions, nous avons l'ensemble de points I et II tableau IV fig.5 Par ces points nous pouvons faire passer graphiquement deux droites qui seront parallèles si le rapport des doses amenant, dans chaque cas, un même % de convulsions, est constant. En effet, ce rapport constant (~~forcément~~) devient ici l'écart logarithmique horizontal entre les deux droites, forcément constant et créant le parallélisme. Par le même raisonnement on voit qu'il suffit de retrancher au log. de la pureté de la préparation I, l'écart logarithmique en question pour avoir la valeur en logarithme de la pureté de la préparation 2.

En effet, si l'on désigne respectivement par P1, P2, les puretés des préparations I et 2, par a) et b), les doses de I et 2 amenant le même pourcentage de convulsions on a :

$$P2 = P1 \times \frac{a}{b}$$

d'où : $\log. P2 \hat{=} \log. P1 + (\text{Log}.a - \log.b)$

et si l'on fait $(\log.a - \log.b) = - E$ (E étant l'écart logarithmique entre les deux droites (et ^{de même} parce que b) est plus grand que a)

on a : $\log. P2 = \log.P1 - E.$

graphiquement $E = 0,180$, ses valeurs limites paraissant être 0,155 et 0,215.

La pureté de la préparation 2 est donc :

$$\text{Log}.16,6 - 0,180 = 1.220 - 0.180 \hat{=} 1.040$$

Antilog. 1.040 = 10.9 u.i/mg.

et les valeurs limites : $\begin{matrix} 10,1 \\ 11,5 \end{matrix}$

2°) Droites Ecartés Equivalents Normaux/Log.Doses

Si maintenant, on porte en abcisses les log. des doses et en ordonnées les % de convulsions traduits en E.E.N. (voir paragraphe A II) on obtient les groupes de points I et II tableau V fig.6. On trace "~~à l'oeil~~" les droites les plus probables. On peut les vérifier par la méthode des moindres carrés, mais très souvent, avec un peu d'habileté, le tracé graphique est suffisant. Elles sont écartées horizontalement de 0.190 en log. avec des écarts maxima de 0,160 et 0,225.

Ces valeurs nous donnent :

Pureté de la préparation 2 : 10,7 ui/mg.

Valeurs limites : $\begin{matrix} 9,8 \text{ ui/mg.} \\ 11,4 \text{ ui/mg.} \end{matrix}$

C - POSITION LA PLUS PROBABLE DE LA LIGNE DROITE

Alors que les résultats de la préparation 2 sont très homogènes, et qu'il est facile de construire graphiquement la droite représentative, il n'en est pas de même pour ceux de la préparation I.

La méthode des moindres carrés est assez longue. Nous avons essayé d'appliquer les méthodes récentes des statisticiens FISHER et BLISS (10) basées d'ailleurs sur la précédente. Il serait trop long de les détailler ici. En voici le résumé :

On transforme les % convulsions en probits (voir paragraphe A II p.6) qu'on appelle " Probits empiriques". Par ces points expérimentaux, on trace une ligne droite en première approximation.

Les nouveaux points obtenus sont les " probits attendus" et l'on calcule d'après eux d'autres valeurs qui sont les valeurs les plus " probables" que l'on puisse obtenir expéri-

mentalement. L'Auteur les appelle " probits corrigés".

Si probits empiriques et probits corrigés coïncident ou presque, la position est bonne. Sinon, on trace d'après les "probits corrigés" cette fois, une deuxième droite en deuxième approximation et l'on recommence jusqu'à obtenir satisfaction. La méthode est d'ailleurs facilitée par l'usage de tables et les valeurs 0 % et 100 % sont également utilisées.

Dans notre cas, après avoir tracé graphiquement la ligne II dans sa position définitive, nous avons en deux approximations (Tableau VI) obtenu la courbe I fig.7.

Un calcul identique à celui du paragraphe B donne : Pureté de la préparation 2 : 11.2 ui/mg.

Remarques.- Cette dernière méthode a éliminé les valeurs 85 et 90 % (Tableau II) nous avons vu d'ailleurs pour quelles raisons elles étaient vraisemblablement trop faibles. Nous les écartons.

Si enfin nous traçons côte à côte les courbes % Convulsions/Doses obtenues en convertissant les droites probits/log. Doses définitives de la fig.7 et les points expérimentaux nous voyons l'homogénéité des résultats. Tableau VII fig.8.

N.B.- La préparation n°2 titrée par des expérimentateurs indépendants, avec la méthode des Glycémies (lapin) se révèle contenir 11 ui/Mg.

CONCLUSIONS

L'examen des différents résultats de cet ensemble d'essais nous montre que le titrage sur le lapin a donné le même chiffre que les calculs effectués sur les courbes de convulsions (rats). Nous avons supposé que les déplacements de la "caractéristique" obtenue de la façon décrite étaient insignifiants depuis le début des essais. La concordance précédente semble renforcer cette impression.

Il est à noter également l'homogénéité des résultats, surtout dans l'essai de la préparation 2, fait dans un temps plus restreint.

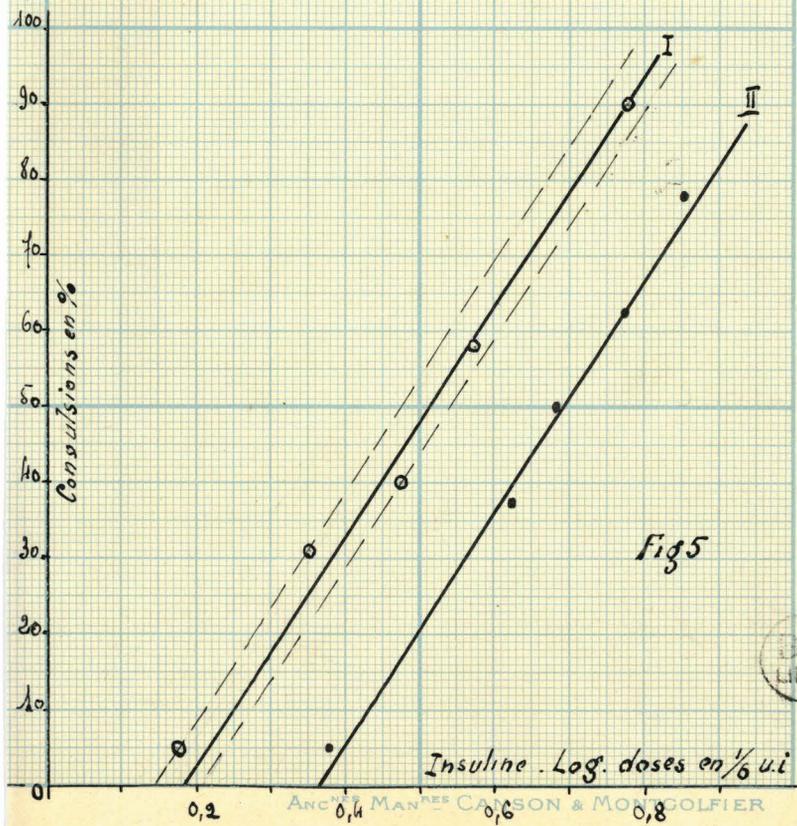
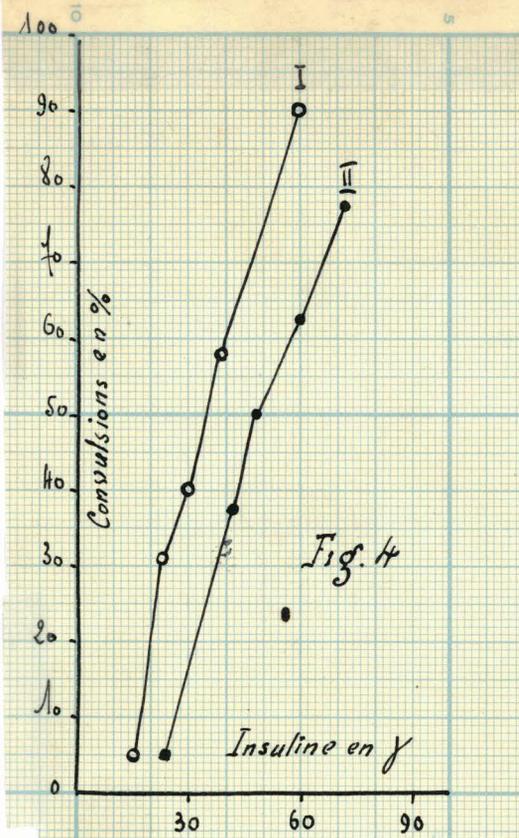
Notons aussi qu'on arrive au même chiffre par les différentes méthodes de calcul. Toutefois les dernières ont l'avantage d'utiliser des droites, de construction graphique plus facile.

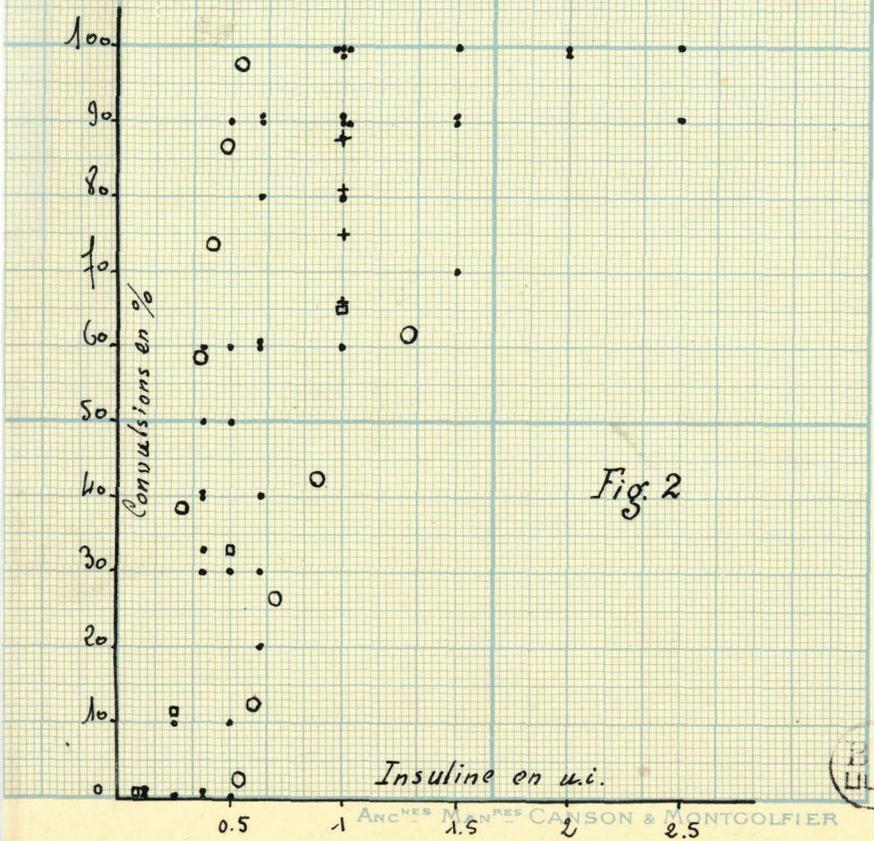
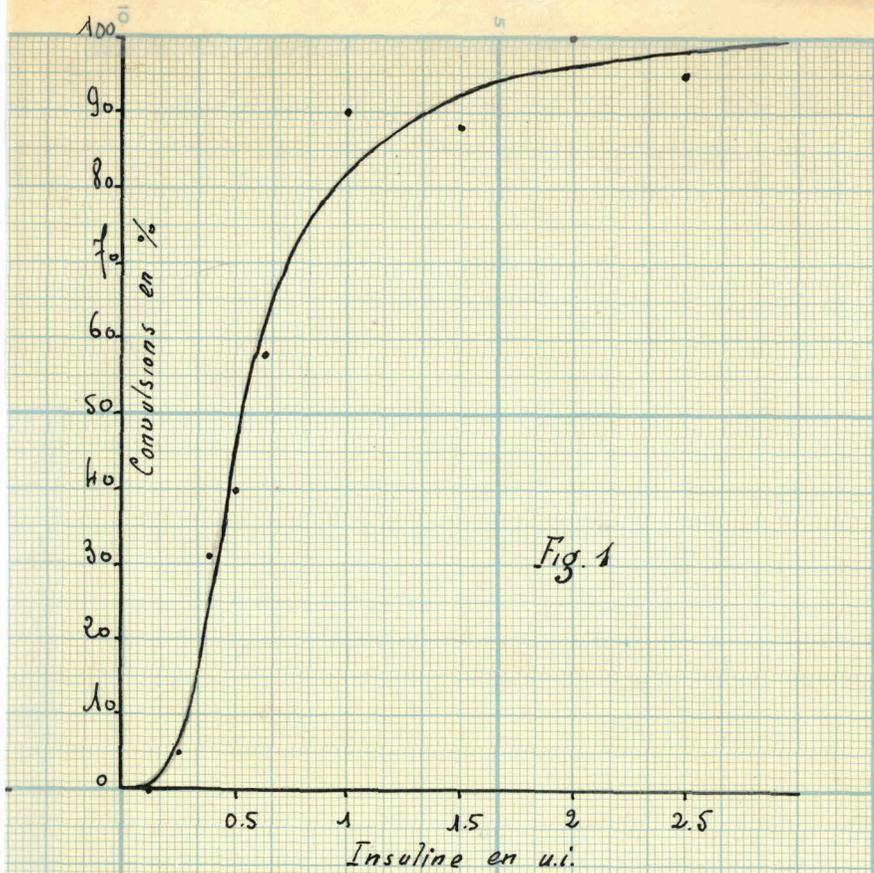
TABLEAU IV

Courbe I			Courbe II		
Dose en 1/6 ui.	Log. doses	% Convulsions.	Dose en 1/6 ui.	log.doses	% Convulsions.
.5	0.176	5	2.4	0.380	5
.25	0.352	31	4.2	0.623	37.5
.	0.477	40	4.8	0.681	50
.75	0.574	58	6.	0.778	62.5
.	0.778	90	7.2	0.857	78

TABLEAU V

Courbe I		Courbe II	
Log. doses en 1/6 ui.	E.E.N.	Log. doses en 1/6 ui.	E.E.N.
0.176	-1.6	0.380	-1.6
0.352	-0.52	0.623	-0.35
0.477	-0.22	0.681	0
0.574	+0.2	0.778	+0.4
0.778	+1.32	0.857	+0.8





L. L. M.

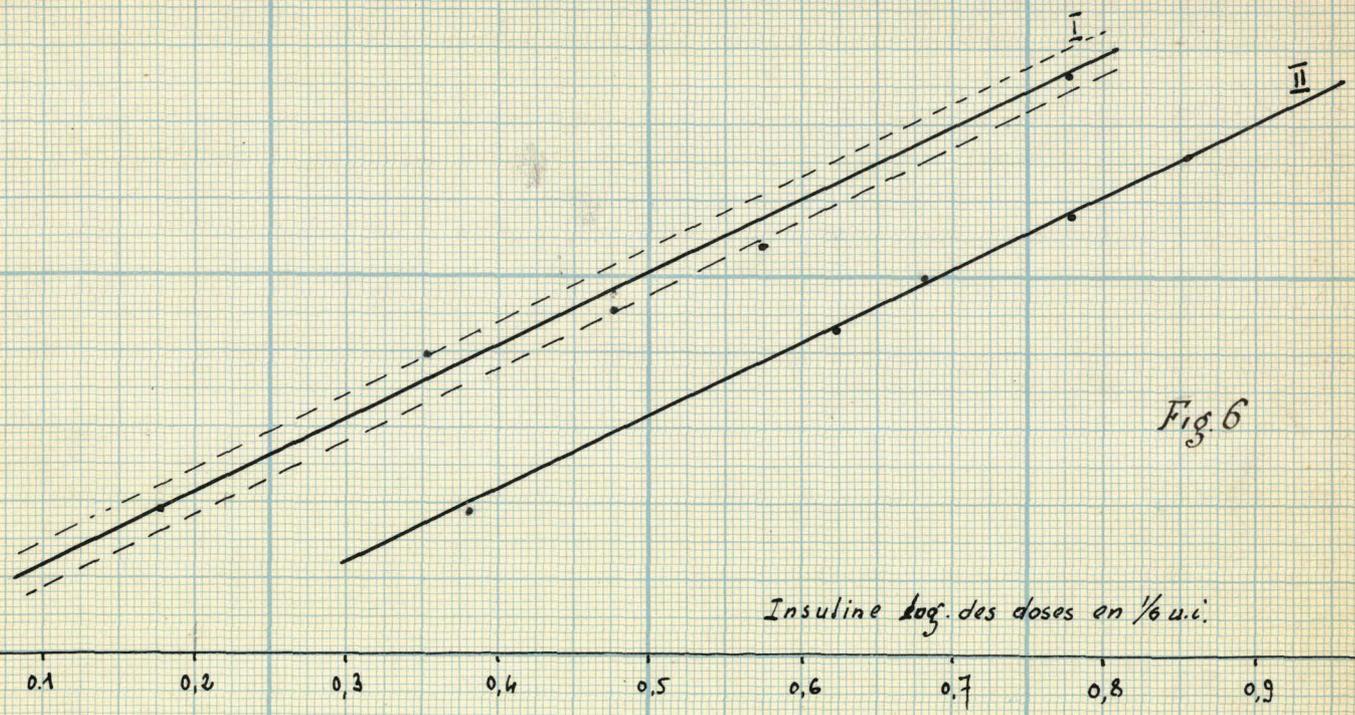


Fig. 6



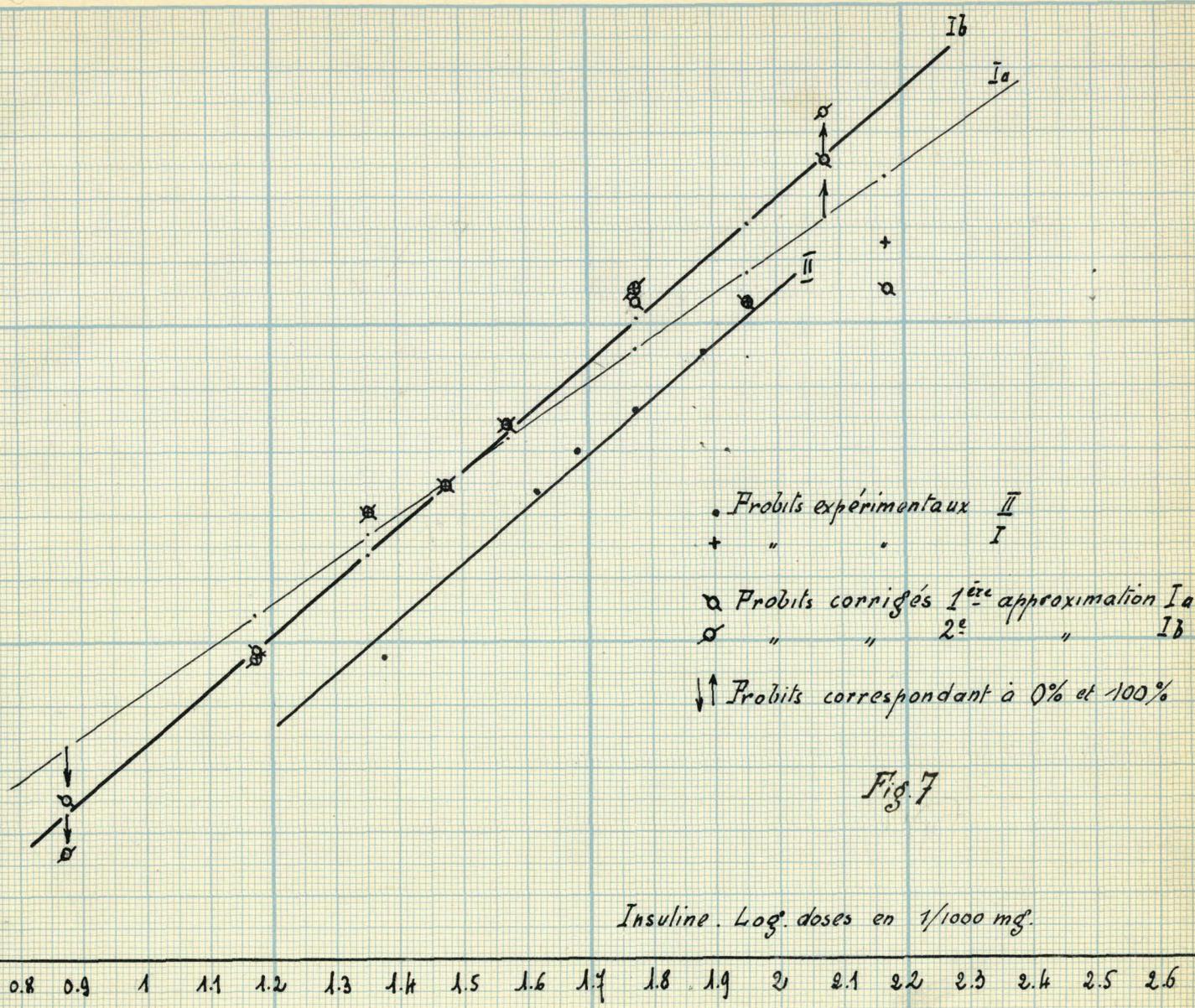
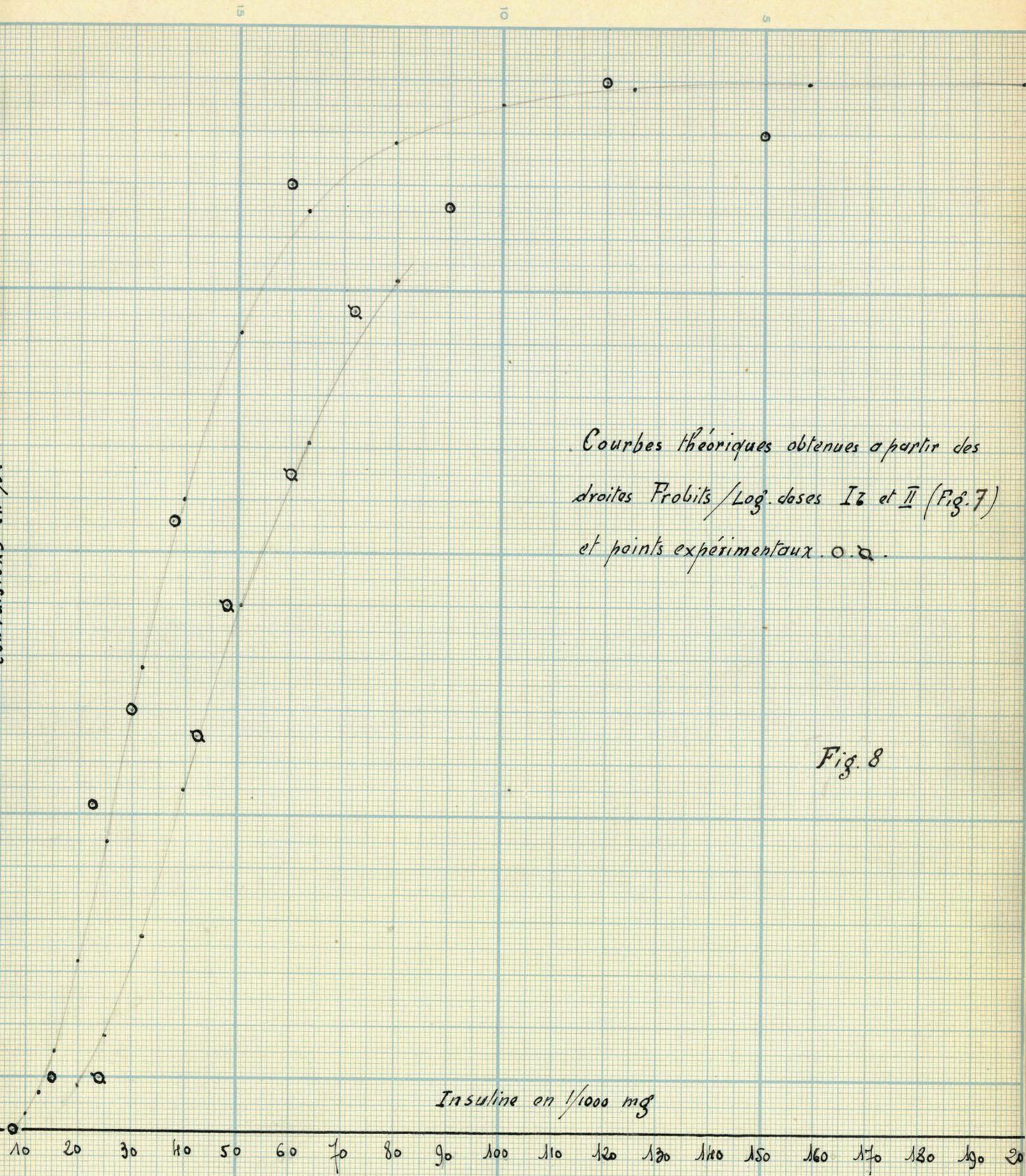


Fig 7



Convulsions en %.



Courbes théoriques obtenues à partir des droites Probits/Log. doses I₁ et II (Fig. 7) et points expérimentaux. o. •.

Fig. 8



TABEAU VI

ourbe I

doses en 1000 mg.	Probits expéri- mentaux	Première approximation		2e approximation	
		Probits at- tendus.	Probits ^{HC} corrigés	Probits attendus	Probits corrigés
.875	-	2.675	2.277	2.150	1.832
.176	3.355	3.700	3.426	3.400	3.356
.353	4.504	4.350	4.512	4.200	4.539
.477	4.747	4.747	4.747	4.750	4.750
.574	5.202	5.100	5.201	5.201	5.254
.778	6.282	5.800	6.186	6.050	6.253
.954	6.175	6.400	6.139	6.800	5.736x
.079	-	6.850	7.296	7.300	7.679
.176	6.645	7.150	6.276	7.750	3.235 x

ourbe II

.380	3.355	<p>Dans la deuxième approximation les écarts entre Prob."attendus" et "corrigés" sont plus faibles et répartis plus régulièrement, sauf pour les valeurs (x). Celles-ci correspondent à des % douteux (p.) et sont à éliminer (p.)</p>			
.623	4.681				
.681	5.				
.778	5.318				
.857	5.772				

TABLEAU VII

Courbe I			Courbe II		
des doses	Probits	% convuls.	Log. des doses	Probits	% Convuls.
0.9	2.250	-			
I.	2.700	1.5			
I.I	3.150	3.5			
I.2	3.550	7.5			
I.3	4.	16.	I.3	3.250	4
I.4	4.400	27.5	I.4	3.650	9
I.5	4.850	44.	I.5	4.100	18.5
I.6	5.250	60	I.6	4.550	32.5
I.7	5.700	76	I.7	5.	50.
I.8	6.150	87.5	I.8	5.400	65.5
I.9	6.550	94.	I.9	5.850	81
2	7	97.8			
2.1	7.400	99.2			
2.2	7.850	99.8			
2.3	8.250	-			

C - ETABLISSEMENT DU TITRAGE - COMPARAISON ENTRE
L'INSULINE CRISTALLISEE ET LE CHLORHYDRATE D'INSULINE

Nous avons comparé, jusqu'ici, l'action convulsivante de deux préparations d'insuline cristallisée. Nous allons maintenant, dans une dernière série d'essais qui serviront pour l'établissement de la méthode définitive, comparer une préparation d'insuline cristallisée et une préparation de chlorhydrate d'insuline. Ici encore les résultats seront comparés à ceux de la méthode des glycémies, obtenus après coup par d'autres expérimentateurs.

à) Description de la technique.

Etalon et substance inconnue sont injectés en même temps dans les conditions expérimentales fixées précédemment. Pour apporter toute la rigueur désirable au titrage, il importe de grouper les essais nécessaires dans le minimum de temps compatible avec le nombre d'animaux que l'on possède. Bien que les variations de sensibilité dans le temps semblent assez faibles, elles sont, ^{en core} ~~de plus,~~ neutralisées par une répartition judicieuse des doses injectées et des lots.

TABEAU VIII

Supposons un stock de 80 rats. Nous les répartissons en 8 lots de 10 rats : A.B.C.D.E.F.G.H.

(Voir ci-après).....

Hypothèse b

	<u>Lot A</u>	<u>Lot B</u>
1	St	Ess.
	<u>Lot B</u>	<u>Lot A</u>
2	St	Ess.
	<u>Lot E</u>	<u>Lot F</u>
3	St	Ess.
	<u>Lot F</u>	<u>Lot E</u>
4	St	Ess.
	<u>Lot C</u>	<u>Lot D</u>
5	St	Ess.
	<u>Lot D</u>	<u>Lot C</u>
6	St	Ess.

M₄

hypothèse c

	<u>Lot C</u>	<u>Lot D</u>
1	St.....	Ess. → δ_1
	<u>Lot D</u>	<u>Lot C</u>
2	St	Ess. → δ_2
	<u>Lot G</u>	<u>Lot H</u>
3	St	Ess. → δ_3
	<u>Lot H</u>	<u>Lot G</u>
4	St	Ess. → δ_4
	<u>Lot A</u>	<u>Lot B</u>
5	St	Ess. → δ_5
	<u>Lot B</u>	<u>Lot A</u>
6	St	Ess. → δ_6

M₅

(St = Standard. Ess. = Essai préparation inconnue.)

b) Calculs

Nous utilisons pour le calcul la relation linéaire E.E.N./log. des doses. Toutefois pour simplifier le titrage et diminuer le nombre d'essais nécessaires, la droite n'est pas construite. seule sa pente est calculée d'après le raisonnement de Marks que voici :

- Si l'on injecte des doses croissantes d'une préparation d'insuline standard, les % de convulsions obtenus

71
 exprimés en probits en fonction des log. des doses, se disposeront suivant la ligne a.

- Si l'on injecte maintenant des doses croissantes d'une préparation inconnue, doses calculées suivant une hypothèse H_b (^{nombre de} ui/mg) quant à sa pureté, nous avons une deuxième droite b. Si l'hypothèse est exacte, les lignes se confondent. Si elle est fautive, elles sont décalées, mais parallèles, l'écart x restant constant, quelle que soit la dose.

De même une autre hypothèse H_c donnerait une troisième droite c parallèle à a et un écart y constant.

Supposons maintenant que les hypothèses H_b et H_c encadrent la vraie valeur de la pureté. Les droites b et c se trouvent de part et d'autre de a.

Dans la figure 1, nous tirons facilement

$$tg \alpha = \frac{y}{\log S - \log S_b} \quad \text{de même } tg \alpha = \frac{x}{\log S_c - \log S}$$

$$d'où : tg \alpha = \frac{x + y}{\log S_c - \log S_b}$$

$$\text{or, } \log S_c - \log S_b = \log \frac{S_c}{S_b} \quad \text{Comme } \frac{S_c}{S_b} = \frac{H_b}{H_c}, \text{ nous}$$

pouvons facilement calculer $tg \alpha$, c'est-à-dire connaître la pente.

En effet, l'expérience nous donne x et y et connaissant H_b nous avons $\frac{S_c}{S_b}$, donc $\log \frac{S_c}{S_b}$.

En pratique, on n'arrive pas, dès le premier essai, à encadrer "la pureté" réelle; les deux hypothèses se trouvent alors du même côté de la vraie valeur; nous avons dans ce cas en raisonnant de la même façon :

Dans la figure 2 :

$$tg \alpha = \frac{x}{\log S - \log S_c} \quad \text{et } tg \alpha = \frac{y}{\log S - \log S_b}$$

et en simplifiant : $\text{tg } \alpha =$

$$\frac{y - x}{\log S_c - \log S_b}$$

En résumé, le numérateur représente l'écart vertical en probits séparant les droites $\text{bet } c$ correspondant aux deux hypothèses et le dénominateur l'écart en log. de ces deux hypothèses.

L'expérience terminée, on transforme les % convulsions en probits et on les dispose suivant le tableau VIII.

Dans ce tableau, $\Delta_1, \Delta_2, \dots, \delta_1, \dots, \delta_2, \dots$ et représentent les écarts en E.E.M. entre le standart et les essais pour chaque hypothèse, M_Δ et M_δ étant leurs moyennes générales respectives. Celles-ci représentent $x (= M_\Delta)$ et $y (= M_\delta)$ On calcule alors la pente.

Puis les moyennes $M_1, M_2, \dots, m_1, m_2, \dots$ donnent, grâce à la pente et à partir de chaque hypothèse, un certain nombre de valeurs de pureté.

La moyenne géométrique des chiffres obtenus représente le titre de la préparation étudiée, l'écart quadratique moyen donnant l'ordre de grandeur de la précision du titrage.

TITRAGES

Nous avons fait deux titrages. Dans le premier, où nous avons encore tâtonné, nous avons modifié en cours de route les quantités injectées et les hypothèses. Mais moyennant une correction, les résultats sont utilisables quand même. Le deuxième peut être considéré comme type.

TITRAGE N°1

Solutions : Standard (St) Etalon L N C 1940 (= Insuline cristallisée)

1 cc = 0.25 mg.

Préparation inconnue (Ess) = Chlorhydrate d'insuline

1 cc = 0.277 mg.

On fait deux hypothèses encadrant la pureté supposée :

H 16 ui/mg (env.) et H 22 ui/mg (env.)

(En fait, c'est le volume de l'injection le plus pratique qui donne l'hypothèse). *de la jurete*

Résultats en % de convulsions - Lots de 10 rats

Au début, nous supposons que notre Etalon a perdu de son activité et nous l'estimons à 20 ui/mg. Par la suite, après titrage de vérification, nous prenons la vraie valeur 22 ui/mg.

PREMIER GROUPE D'ESSAIS : On considère que l'établon fait 20 ui/Mg

et on injecte aux animaux 1,5 ui.

(↓ = injection de la préparation inconnue).

<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0cc 35 → H 15,4 ui/mg)	<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0cc 25 → H 21.7 ui/mg)
90	40	80	50
60	70	60	80

DEUXIEME GROUPE D'ESSAIS : On considère l'étalon contenant 20 ui/mg

et on injecte aux animaux 1 ui

<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0cc 22 → H 16,4 ui/mg)	<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0cc 16 → H 22.5 ui/mg)
60	50	100	50
60	40	70	20
50	40	90	40
60	0	100	40

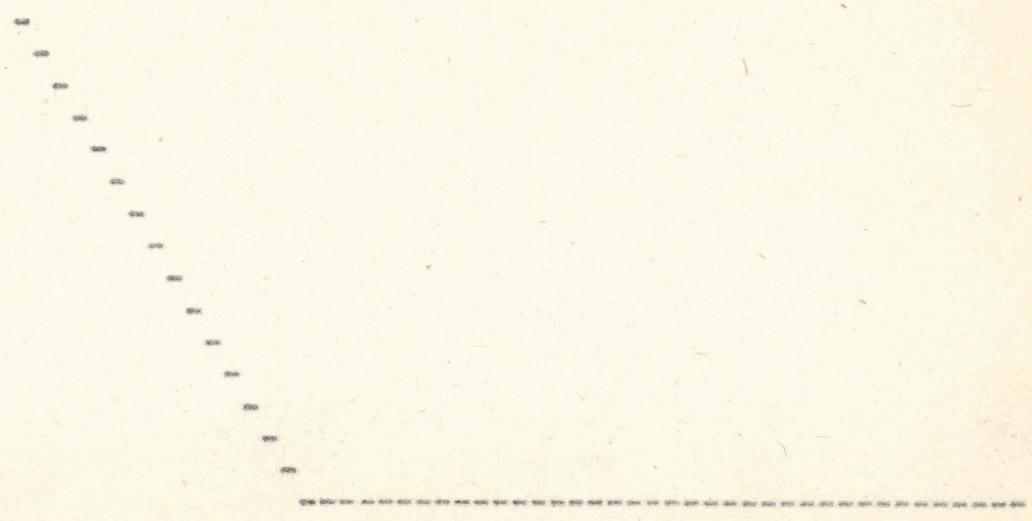
TROISIEME GROUPE D'ESSAIS : On considère l'étalon faisant 22 ui/mg

et on injecte aux animaux 1 ui

<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0 cc 22 → H 16,4 ui/mg)	<u>St</u>	<u>Ess</u> (↓ 0 cc 16 → H 22.5 ui/mg)
40	90	90	60
30	40	60	10

CONVERSION EN PROBITS

(voir ci-après)



CONVERSION EN PROBITS

H 16,				H 22,				
Ess	Δ	(x) Correc- tion	Δ Cor- rigés	St	Ess	δ	(x) Correc- tion	δ cor- rigés
4.747	-1.535	+0.341	-1.194	5.642	5.	-0.842	+0.341	60.501
5.524	+0.271	+0.341	+0.612	5.253	5.842	+0.589	+0.341	+0.930
5	-0.253	+0.341	+0.088	*8.090	5	-3.090	+0.341	-2.749
4.747	-0.506	+0.341	-0.165	5.524	4.158	-1.366	+0.341	-1.025
4.747	-0.253	+0.341	+0.088	6.282	4.747	-1.535	+0.341	-1.194
*2.674	-2.579	+0.341	-2.238	*8.090	4.747	-3.343	+0.341	-3.002
6.282	+1.535			6.282	5.253	-1.029		
4.747	+0.271			5.253	3.718	-1.535		
<hr/> M. Δ = -0.381				<hr/> M. δ = -1.519				

* On sait que les probits correspondant à 0 % et 100 % sont $-\infty$ et $+\infty$. Pour utiliser quand même les observations de 0 et 100, nous prenons arbitrairement les probits correspondant à 1 % et 99,9 %.

Pour obtenir la pente moyenne, on peut faire la moyenne générale des Δ , que ce soit pour 1,5 ou 1 ui. En effet, la différence en probits doit, en principe, être la même, les droites étant parallèles :

(x) Voir p. suivante.

$$y - x = 1.138$$

$$\log S_c - \log S_b = \log 22,5 - \log 16,4 = 0.138$$

<u>Pente</u> :	pour 1.138 probit	→	0.138 en log.
	pour 1	→	0.12 en log.

(x) En réalité, les deux premiers groupes d'essais ont donné des trop grands du fait de l'emploi de l'étalon sous-estimé (20 au lieu de 22). Il y a donc lieu de faire une correction. On ajoutera algébriquement la différence en probits correspondant à la différence logarithmique de 20 à 22 (et ceci calculé à l'aide de la pente moyenne).

$$\log 22 - \log 20 = 0.041$$

Correction : $\frac{0.041}{0.12} = + 0.341$ en probit.

Moyenne des Δ corrigés et des δ corrigés par groupes de deux
essais

(M1, M2 m1, m2) :

- 0.291	+ 0.214
- 0.038	- 1.887
- 1.075	- 2.098
+ 0.903	- 1.282

Correspondance en log.

- 0.291 x 0.12	=	- 0.034	+ 0.025
- 0.038 x 0.12	=	0.004	- 0.226
etc.		- 0.129	- 0.251
		+ 0.108	- 0.153

Valeurs des puretés en log.

1.187 (log.15.4) - 0.034 = 1.053	1.336 (log.21.7)+0.025=1.361
1.214 (log.16,4) - 0.004 = 1.210	1.352 (log.22.5)-0.226=1.126
1.214 " - 0.129 = 1.085	1.352 " -0.251=1.101
1.214 " + 0.108 = 1.322	1.352 " -0.153=1.199

Moyenne des puretés en log. 1.182

Moyenne des puretés en unités/mgr

15,22 ± 1,2

Ecart quadratique moyen : en log. = 0.105

en unités = 1,2

TITRAGE N°2

Solutions : les mêmes que pour le titrage n°1

Pourcentages des convulsions

H 16,4 ui/mg (↓ 0,22 cc)		H 22,5 ui/mg (↓ 0,16 cc)	
St	Ess.	St	Ess.
100	50	100	60
70	100	100	60
30	33	60	10
60	100	90	20
80	100	90	90
60	70	60	80
0	30	80	30
80	50	90	40

Probits

H 16,4 ui/mg

H 22,5 ui/mg

St	Ess	Δ	St	Ess	δ
3.090	5.000	- 3.090	*8.090	5.253	- 2.837
5.524	*8.090	+ 2.566	*8.090	5.253	- 2.837
4.476	4.560	+ 0.084	5.253	3.718	- 1.535
5.253	*8.090	+ 2.837	6.282	4.158	- 2.124
5.842	*8.090	+ 2.248	6.282	6.282	0
5.253	5.524	+ 0.271	5.253	5.842	+ 0.589
2.674	4.476	+ 1.802	5.842	4.476	- 1.366
5.842	5.000	- 0.842	6.282	4.747	- 1.535

voir page

$M.\Delta = + 0.734$

$M.\delta = - 1.455$

$x + y = 0.734 + 1.455 = 2.189$

$e - \text{Log.Sb} = \frac{\text{Log Sc}}{\text{Sb}} = \frac{\text{log Hb}}{\text{Hc}} = \text{Log 22,5} - \text{Log 16,4} = \underline{0.138}$

Pente : Pour 2.189 probits \rightarrow 0.138 en log.

Pour 1. " \rightarrow 0.063 en log.

Moyennes des Δ et des δ par groupe de deux essais

(M1, M2 m1, m2,) :

- 0.262		- 2.837 → (Ex. : $\frac{2.837 + 2.837}{2}$ 2.837)
+ 1.460		- 1.829
+ 1.259		+ 0.294
+ 0.480		- 1.450

Correspondance en logarithmes :

- 0.016		- 0.178 → (Ex. : 2.837×0.063)
+ 0.091		- 0.115
+ 0.079		+ 0.018
+ 0.030		- 0.091

Valeur des puretés en logarithmes :

1.214 (log 16.4) - 0.016 = 1.198		1.352 (log 22.5) - 0.178 = 1.174
1.214 " + 0.091 = 1.305		1.352 " - 0.115 = 1.237
" " + 0.079 = 1.293		" " + 0.018 = 1.370
" " + 0.030 = 1.244		" " - 0.091 = 1.261

Moyenne des puretés en logarithmes : 1.260

Ecart quadratique moyen : * 0.058

En unités : Pureté de la préparation : 18,2 ui/mg * 1,1

CONCLUSIONS

La préparation d'activité inconnue titrée indépendamment par la méthode de glycémies^{la} (lapin) se révèle contenir 17 ui/mg. Le résultat du titrage type n°2 coïncide donc avec le chiffre précédent, à la dispersion près (* 1,1).

Le titrage n°1 donne un nombre d'unités un peu faible mais à moins de valeur étant donné qu'il nous a servi pour la mise au point.

Enfin si on fait la moyenne géométrique

8

des deux titrages, on obtient le chiffre de 16,6 ui/mg, voisin de 17 ui/mg.

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des résultats exposés ci-dessus a nécessité plus de 1.500 observations individuelles et un total de 4 à 500 rats. Les essais comportant un petit nombre de rats conservent une valeur relative, car ils ont été effectués dans des conditions absolument comparables, sur des animaux rigoureusement standardisés.

Nous avons comme but de comparer l'"action convulsivante" de l'insuline cristallisée et du chlorhydrate d'insuline. Pour cela il nous a fallu mettre au point une méthode d'estimation de cette action. Nous avons choisi le Rat et nous nous sommes inspiré de la méthode de la Souris en cherchant à utiliser des lots d'animaux restreints. Nous y sommes arrivé grâce aux méthodes statistiques modernes que nous avons schématisées.

Dans ces conditions, à activité hypoglycémianté égale, l'insuline cristallisée et le chlorhydrate d'insuline ont la même "action convulsivante". En effet, titrés par l'une ou l'autre méthode (glycémie et convulsions) contre un même étalon, elles ont donné le même résultat.

Pourtant, la méthode des convulsions, quand on utilise la Souris, donne en général des résultats plus forts. A quoi attribuer alors cette divergence ? Est-ce à la physiologie très différente entre Rat et Souris, en apparence seulement "frère et soeur" - comme cela se voit quand on étudie l'action détoxiquante des composés thyroïdiens vis à vis de l'acétonitrile ? Ou plutôt, - et c'est ce que nous croyons - parce

81

que l'insuline est injectée dans nos essais en solution aqueuse acide. En 1936, MARKS, titrant le nouvel étalon international d'insuline a obtenu, avec l'eau acide, et à l'inverse des autres laboratoires utilisant le sérum physiologique comme solvant de l'insuline, des résultats identiques avec les convulsions de la Souris et la glycémie du Lapin. Dans la discussion de ses résultats, il mettait en relief le rôle possible du NaCl dans le déclenchement des crises.

Ce travail a été l'occasion d'autres observations : Nous avons vu le jeûne et la température augmenter l'action convulsivante.

La concentration de la solution injectée a aussi un rôle important. Plus elle est grande et plus l'action est forte.

L'examen des courbes % convulsions/doses montre que le Rat est relativement résistant à l'action convulsivante de l'insuline, fait signalé par divers Auteurs. Pourtant, dans nos essais, sa sensibilité ou plus exactement la répartition des sensibilités individuelles est telle que ladite courbe est utilisable pour le titrage. En moyenne, les % convulsions passent de 0 à 100 pour des doses de 1/4 à 2 ui. La quantité choisie comme unité internationale (1/22 de mg étalon international) correspond environ à D.C. 90.

Enfin l'allure des différents graphiques justifie l'emploi des méthodes mathématiques décrites. En particulier les courbes I et surtout II fg 7 ne nous interdisent pas de supposer, comme l'a démontré HEMMINGSEN pour la Souris, que les logarithmes des doses convulsivantes individuelles chez le Rat, sont "distribués normalement".

Monsieur le Professeur R. HAZARD, qui a bien voulu nous faire l'honneur de lire ce travail, nous a fait les critiques suivantes :

- " Les phénomènes physiologiques utilisés
- " comme base du titrage sont insuffisamment décrits. Ils
- " sont complexes : chacun des symptômes : convulsions -
- " paralysie - coma - peut correspondre à des degrés d'hy-
- " hypoglycémie différents, ce qui rend fragile la base même
- " du titrage.

Nous n'ignorions pas ces difficultés quand nous avons entrepris ce travail. C'est d'ailleurs la principale des critiques formulée contre le titrage de l'insuline par les convulsions de la Souris (voir p.).

Mais le but de ce travail n'est pas d'étudier les relations physiologiques unissant " convulsions" et hypoglycémie. Il est, comme nous le disions dans la discussion générale, de comparer les actions convulsivantes de l'insuline cristallisée et du chlorhydrate d'insuline.

Or, quand nous avons observé l'allure des convulsions insuliniques chez le Rat, nous avons retrouvé les différentes figures décrites pour la Souris. Cette similitude sensible est la raison pour laquelle nous ne nous sommes pas attardé à les décrire, voulant éviter de reprendre les expressions des savants qui ont attaché leurs noms au titrage sur la Souris (Voir par exemple HANSEN et KRUGER S.B.M. C.M. 398 p.41)

Les manifestations extérieures sous l'action de l'insuline ont des formes variées suivant les animaux ou chez un même animal. Etant donné l'ignorance actuelle de leur signification physiologique exacte, nous avons à la suite des Auteurs précités, rangés les divers phénomènes observés et décrits

p. sous le terme général de "Convulsions". Le mot "crise", parfois employé, a peut-être un sens plus général encore, mais il est aussi plus vague et moins suggestif.

Les divers phénomènes nerveux et musculaires apparents que l'on observe simultanément dans un groupe d'animaux en expérience (convulsions - paralysie - coma) correspondent ils chez le rat à des degrés d'hypoglycémie différents ? Nous ne pouvons pas y répondre d'une façon certaine.

Toutefois, nous nous référons à un travail de Mademoiselle BOILLOT (communication personnelle) qui a trouvé pour les variations de la glycémie en rapport avec l'apparition des convulsions, un certain parallélisme entre le Lapin et le Rat.

Voici quelques-uns de ses chiffres :

Glycémie initiale - prise de sang dans la jugulaire

Rats à jeun - 150 à 200 g.

Valeurs extrêmes : 0.91 à 1.21 g. $\frac{\%}{100}$

Moyenne sur 34 rats : 1,02 g $\frac{\%}{100}$

Glycémie de Rats en " convulsions " (mêmes conditions expérimentales)

a) Convulsions proprement dites :

0,38 - 0,24 - 0,33 - 0,43 - 0,33 - 0,43 - 0,38 g $\frac{\%}{100}$

Moyenne sur 7 rats : 0,36 $\frac{\%}{100}$

Chute moyenne : 64 %

b) Coma

0,29 - 0,29 - 0,33 - 0,43 g $\frac{\%}{100}$

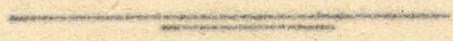
Moyenne sur 4 rats : 0,33 g $\frac{\%}{100}$

Chute moyenne : 67 %

Bien que peu nombreux ces résultats montrent que les variations individuelles dans chacun des deux

groupes de symptômes sont au moins aussi importantes que les différences qui peuvent exister entre les deux groupes.

Disons enfin que cette méthode, assise sur un phénomène de base imprécis, assujettie aux grands nombres d'animaux pour prendre son entière valeur, ne peut prétendre qu'à suppléer. Le titrage de l'insuline par la méthode des glycémies sur le Lapin, reste par sa simplicité de calcul, sa précision et sa signification physiologique, le plus satisfaisant.



Rappel des notions acquises et idées générales.

I.- Expérimentation en milieu homogène.

- 1 - Essai préliminaire.
- 2 - Influence du terpinéol.
- 3 - Pénétration en différents points du tube digestif.
- 4 - Courbe d'action/doses en instillation intra-anale.
- 5 - Influence de la triéthanolamine.
- 6 - Action des excipients sur la glycémie.

II.- Expérimentation en milieu hétérogène.

- 1 - Suspension Eau/Terpinéol
- 2 - Action des corps tensio-actifs.

III.- Discussion Générale

IV.- Conclusions : Activité de l'insuline suivant la voie d'administration.

ABSORPTION et ACTION DE L'INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE .-

L'absorption de l'insuline par la voie digestive et son action dans ces conditions ont fait l'objet de nombreuses recherches dont certaines sont déjà très anciennes.

On trouvera la bibliographie de cette question dans les bonnes monographies sur l'insuline ().

En 1938, JENSEN écrit : "As can be seen, the oral administration of insulin, either alone or mixed with various substances, or of certain insulin derivatives has thus far been unsuccessful from a practical point of view".

Depuis cette date les travaux ont continué dans différents pays pour trouver des formules susceptibles d'application thérapeutique. Un certain nombre d'auteurs ont même publié des résultats positifs sur des diabétiques.

De 1945 à 1947, reprenant les travaux de LASH et SCHÖNBRUNER, M.DEROT, de TRAVERSE et P.LAURENT ont obtenu des actions hypoglycémiantes très marquées chez le chien avec des solutions d'insuline protégée des ferments par des colorants acides et basiques et contenant un composé tensio-actif : la saponine.

En 1945 également, GINESTE, MERVILLE et DOUAY ont démontré l'action perlinguale de l'insuline.

L'absorption de l'insuline par la voie digestive se heurte à deux obstacles : 1°/-la destruction par les ferments digestifs, 2°/-le passage difficile de la muqueuse digestive.

C'est pour tourner ces difficultés que LASH et SCHONBRUNNER, puis DEROT et coll. ont inhibé les ferments digestifs par des colorants et tenté de faire traverser la muqueuse par l'insuline en s'aidant de la saponine.

Malheureusement ce dernier composé est très toxique et doué d'une activité hémolytique dangereuse. Ces données semblent par conséquent d'application pratique douteuse.

Dans la série des expériences qui seront décrites ci-dessous nous avons tenté de faire pénétrer l'insuline à travers la barrière intestinale à une vitesse suffisante pour que la destruction soit la moins importante possible. L'emploi d'un agent de pénétration non toxique et autant que possible inerte du point de vue physiologique éviterait à la fois les dangers de corps comme la saponine et les conséquences redoutées de l'action prolongée des inhibiteurs des ferments digestifs.

Nous nous sommes appuyés sur l'ensemble des travaux récents effectués dans le domaine de la pénétration des médicaments à travers

(x)
la peau .

C'est ainsi que nous avons été amenés à expérimenter des agents de pénétration comme le terpinéol et l'eucalyptol.

I.- EXPERIMENTATION EN MILIEU HOMOGENE

Dans des essais d'orientation, il nous fallait introduire l'insuline dans un excipient solide permettant la confection de suppositoires. Or l'insuline, soluble dans l'eau, est insoluble dans les lipides. Par conséquent le beurre de cacao, excipient classique était à rejeter.

Nous avons utilisé les poly-éthylène-glycols dont la consistance augmente avec le degré de polymérisation.

La solubilisation de l'insuline dans ces polymères solides n'allait pas sans difficulté; surtout si l'on voulait obtenir des préparations soigneusement titrées.

Nous les avons tournées en solubilisant au préalable l'hormone dans un glycol peu toxique : le propylène glycol.

On arrive à préparer des solutions d'insuline très concentrées et homogènes dans ce solvant en acidifiant par une quantité convenable d'HCl concentré. Une fois la solution obtenue on la titre et on l'introduit dans le polyéthylène-glycol fondu au bain marie à 37°. Après avoir homogénéisé on refroidit rapidement. On a ainsi une composition solide et standard contenant l'insuline.

L'expérimentation physiologique a donc débuté par l'administration au lapin à jeun des suppositoires confectionnés avec cette composition.

I)- EXPERIMENTATION :

Composition solide contenant l'insuline : (I.C.P.)

- Polyéthylène-glycol (Carbowax 4.000) 20 g.
- Propylène-glycol 4 cm³
- HCl N, q.s.p. pH 3.5 à 4.
- Insuline q.s.p. 3 g. de composition = 50 u.i. env.

Protocole expérimental :

De façon générale dans l'ensemble des essais qui suivent, nous utilisons le lapin "tout venant" dont le poids va de 1,800 Kg. à 2,800 Kg.

Les conditions d'approvisionnement en animaux ne nous permettent pas de discriminer entre la race, l'âge exact, le sexe, etc...

.../...

) En cours de rédaction nous avons pris connaissance du travail de SPRING et VALETTE.

Pour atténuer l'influence des variations de poids corporels nous administrons les produits en doses proportionnelles aux poids. Pour diminuer les écarts individuels obligatoirement importants avec une population disparate, nous groupons nos animaux par lots de 6 de façon la plus homogène possible et n'utilisons que les moyennes cohérentes dans nos résultats.

L'alimentation est standard:

*Farine de céréales
graines : avoine - orge
Verdure : choux carottes etc
Eau à volonté*

et est donnée ad libitum.

Les animaux sont mis à jeun 16 heures avant l'expérience pour les injections ou les administrations par la bouche, 19h. pour les administrations par le rectum. Le sang est prélevé dans la veine marginale de l'oreille et la glycémie titrée par micro-Baudouin sur 1/4 cm³ de sang.

Résultats : Voir courbe N°I

Conclusions : Légère action hypoglycémiant pour des doses importantes d'insuline. Remontée intermédiaire et passagère de la glycémie vers 1h.1/2 à 2h. (dont nous aurons l'explication plus loin).

2)-INFLUENCE DU TERPINEOL :

Comme nous l'indiquons dans le préambule; les travaux récents ont montré le rôle des agents de pénétration à travers les tissus. Parmi ceux-ci nous avons choisi le terpinéol, produit relativement peu toxique.

Le terpinéol est facilement miscible aux solutions d'insuline dans le propylène-glycol. Nous avons pris arbitrairement la proportion de 10 % pour commencer nos essais.

La solution d'insuline-propylène-glycol-terpinéol est homogénéisée comme plus haut avec un polyéthylène-glycol solide; et administrée aux animaux.

Expérimentation :

- Composition solide à base d'Insuline : (I.C.T.P.)

Composition précédente 40 g.

Terpinéol 4 g.

Insuline et HCl N q.s.p. pour 3 g. = 40 u.i.env.

.../ ...

Fig. 1

I.C.P.

Appositoire par lapin
 Iron 50 u.i./lapin
 éné sur 12 lapins.

22 au 25 juin
 1948.-

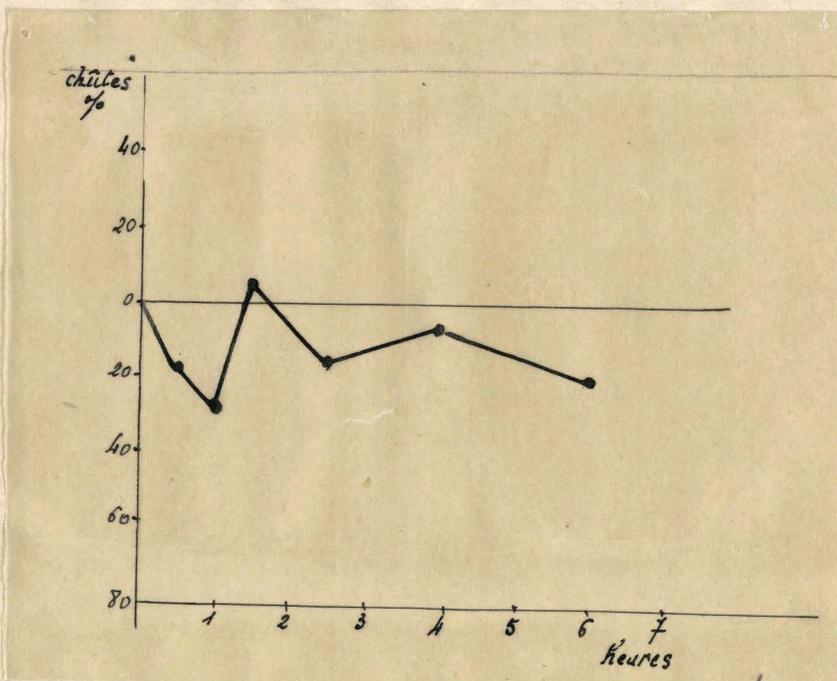


Fig. 2

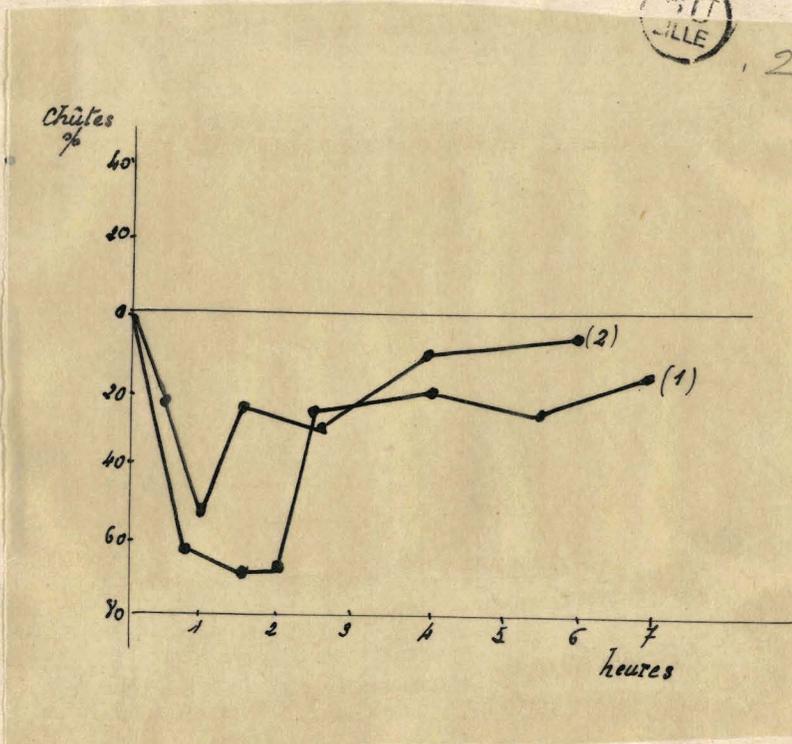
I.C.T.P.

Appositoire par lapin
 pour (1):40 ui/lapin
 " (2):27 ui/lapin.

23/9/48

énes sur 6 lapins (1)
 " " 3 " (2)

2t 22/10/48.-



- Protocole expérimental : habituel.

Résultats :

Courbes moyennes à 27 et à 40 u.i./Kg (Voir Fig.n°2).

Conclusions :

Action immédiatement plus marquée. Un lapin est mis en convulsions. La forme de la courbe est particulière. Elle accuse une chute brutale et précoce de la glycémie suivie d'une remontée rapide mais partielle, puis apparait une phase de remontée plus lente après la 5^{ème} heure. Nous verrons plus tard que cette forme est artificielle.

Quoiqu'il en soit la présence de terpinéol a immédiatement amélioré le passage de l'insuline à travers la muqueuse intestinale ou tout au moins favorisé son action.

3) - ETUDE DE LA PENETRATION EN DIFFERENTS POINTS DU

TUBE DIGESTIF :

Pour étudier avec le plus de facilité et de précision possible la pénétration de l'insuline; il nous fallait nous fixer un point ~~d'impact~~ ^{d'introduit} où l'action étudiée serait la plus stable.

Partant cette fois d'une solution homogène et connue d'insuline dans un mélange propylène-glycol/terpinéol, nous l'avons administrée à différents points du tube digestif. Pour cela un certain nombre de lapins ont été préparés avec des fistules, le point de fixation de ces dernières variant de l'estomac à l'anus et débouchant toutes à l'extérieur.

Nous avons ainsi réalisé des fistules gastriques, duodénales proximales, duodénales distales, jéjunales, iléales. Le rectum était atteint par instillation intra-anales.

Expérimentation :

- Solution d'insuline contenant: (I.T.P.)

Propylène glycol 9 parties

Terpinéol 1 partie

Insuline et HCl N, q.s.p. 1 cm³ = 40 u.i.env.

- Volume injecté : 1 cm³/_{Kg} soit 40 u.i./Kg.

Résultats :

-Fistule gastrique

- duodénale proximale : Courbes n°3

- duodénale distale : " n°4

- jéjunale : " n°5

.../...

INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

Introduction par fistules.

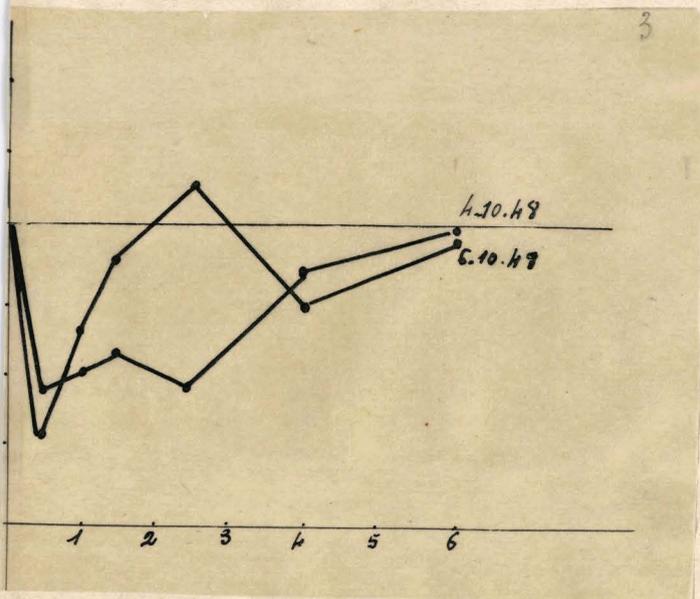
91

I.T.P.

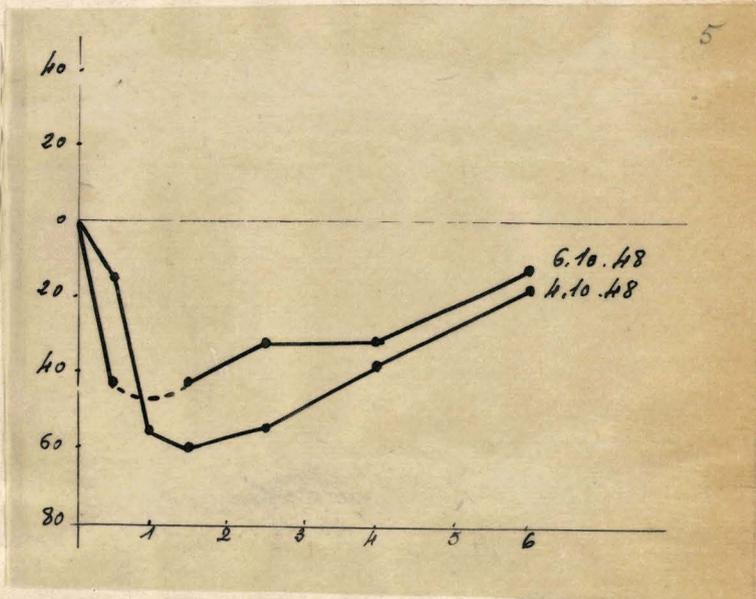
1 cm³/Kg - soit 8

Fig. 4

Fig. 3



duodénum proximal



duodénum proximal

Fig. 5

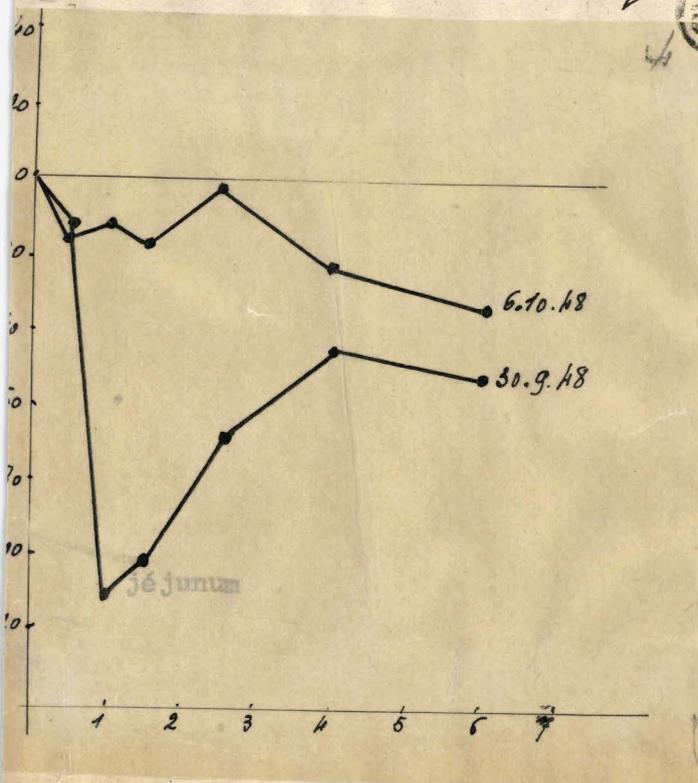
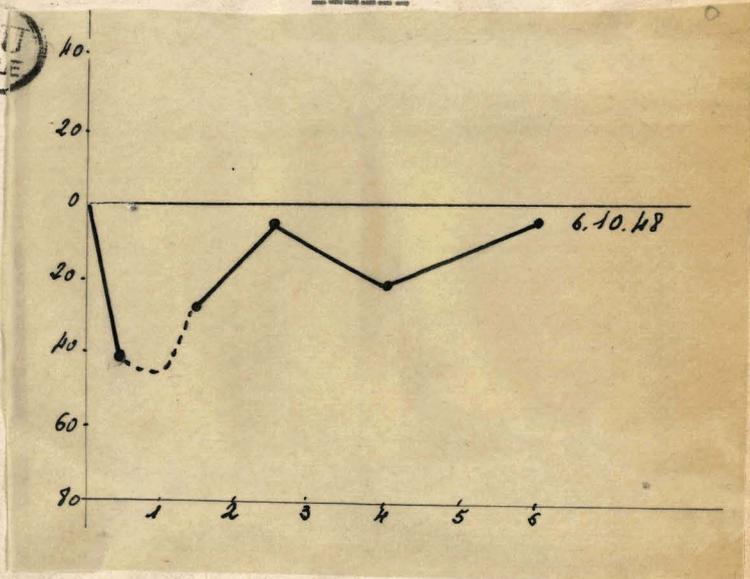


Fig. 6



iléon



.../...

- , il / éale : courbe n°6

- , instillation rectale : " n°7

Conclusion :

Introduite directement dans l'estomac, la préparation n'a pas été très active. Toutefois ce problème sera repris car il y a peut être des facteurs étrangers à l'expérience qui interviennent, comme par exemple, la grande dilution que subit la solution d'insuline dans le liquide gastrique.

Par contre toutes les fistules intestinales ont donné de bons résultats.

Bien que portant sur un nombre restreint d'animaux, étant données les difficultés que rencontre ce genre d'expérimentation, les courbes obtenues révèlent: 1°/ quel que soit le lieu d'introduction dans l'intestin, l'insuline a été active,

2°/ Son action est irrégulière d'un essai à l'autre et cela pour des raisons qui nous échappent,

3°/ Les seuls résultats réguliers que nous avons pu observer sont ceux donnés par instillation rectale.

Nous avons donc choisi cette voie d'introduction pour étudier les différents véhicules susceptibles de faire franchir rapidement à l'insuline la barrière des tissus.

4) - COURBE D'ACTION DE I.T.P. en INSTILLATION ANALE :

En nous fixant sur le mode d'administration c'est à dire l'instillation par une sonde anale, nous introduisons dans le rectum à 4cm environ, un volume constant d'une solution homogène d'insuline.

Expérimentation :

- Solution d'insuline :

- propylène glycol 90 %

- terpinéol 10 %

Les solutions étudiées correspondent à I3# - 8 - 10 - 15 et 40 u.i/cm³.

Résultats :

Voir courbes 7a.

Conclusions :

La figure 7a résume l'ensemble des résultats.

93

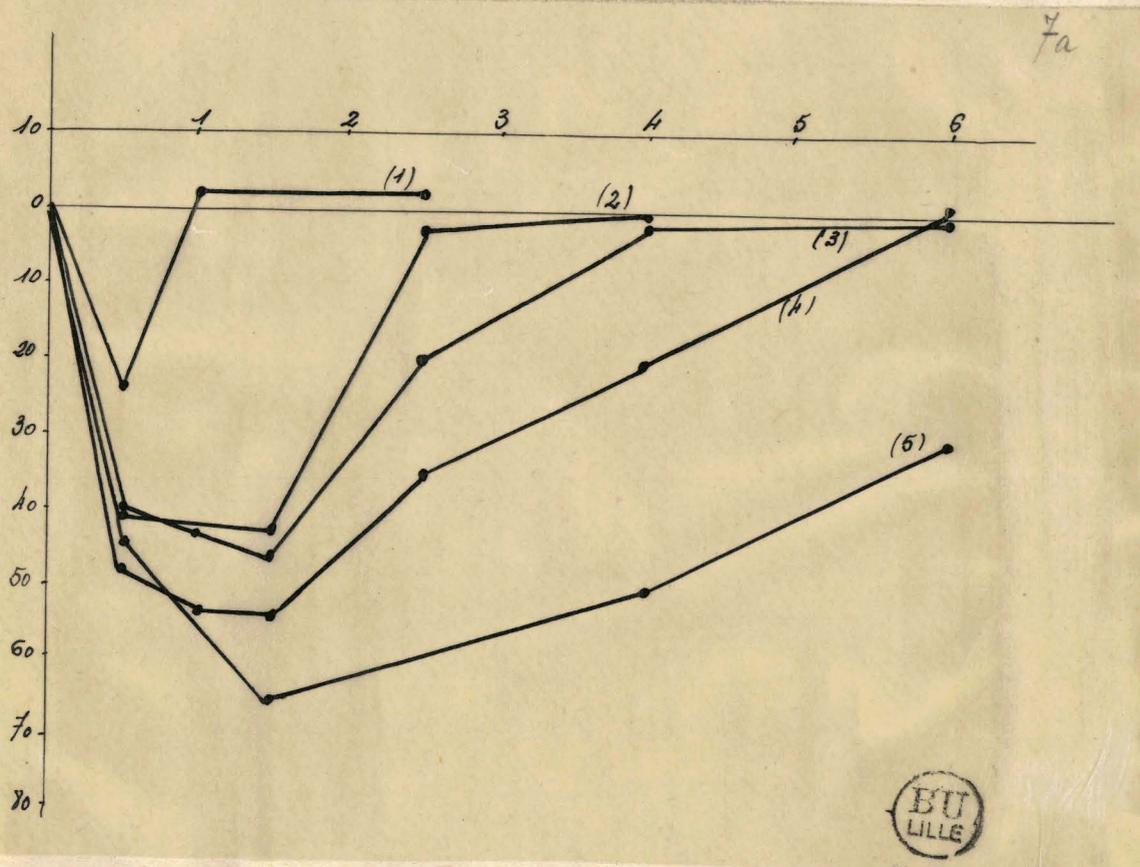
INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

COURBE D'ACTION/ DOSES.

-.-.-.-.-

I.P. Instillation rectale - 1cm ³ /Kg soit	1 : 1,3 u.i./kg	- 3 lapins)	
	2 : 8	" - 4 "	} 29/6 au
	3 : 10	" - 6 "	
	4 : 15	" - 4 "	} 22/7/1948.-
	5 : 40	" - 4 "	

Fig. 7 a



94

La comparaison des courbes d'action de l'insuline par l'injection sous-cutanée et par instillation anale est assez difficile car les aires d'hypoglycémie sont de formes différentes.

Il y a en effet plusieurs façons de mesurer l'activité de l'insuline. La méthode officielle du Codex français préconise de faire la moyenne des glycémies au bout de 1h.1/2 et de 2h. 1/2 estimant que cette zone représente la chute maximum.

Cependant l'action thérapeutique réelle de l'insuline ne dépend pas seulement de la flèche mais également de toute la surface de l'hypoglycémie ainsi d'ailleurs que des temps caractéristiques. C'est ce qui complique la comparaison des différents types d'insuline.

Dans notre cas, l'hypoglycémie maximum est atteinte très rapidement 1h. à 1h.1/2 mais remonte aussi très brusquement.

Nous verrons d'ailleurs plus loin que cette remontée brutale est artificielle et est due à la superposition de l'action propre d'un des véhicules utilisés.

Quoi qu'il en soit nous utiliserons pour construire la courbe d'action (7b), les chutes maxima, autrement dit la flèche d'hypoglycémie.

La figure 7c, courbe 3, représente cette courbe mise sous la forme semilogarithmique. Nous y avons ajouté les courbes obtenues par injection sous-cutanée par d'autres auteurs MARKS (courbe 2) et GLEY (courbe 1).

Notons que le premier auteur a utilisé non pas les glycémies minima mais la moyenne des glycémies prises toutes les heures pendant 5 heures.

Le deuxième auteur utilise les chutes maxima et a étudié de près la fonction mathématique de cette courbe d'action. D'après lui la première partie de celle-ci aurait la forme suivante.

$$y = \sqrt{2Kx}$$

Pour nos comparaisons et en première approximation, nous avons

porté ces différents résultats sous forme semi-logarithmique qui est suffisante pour le but poursuivi.

L'examen de ces courbes ^(7c) montre que l'action de l'insuline par voie intestinale suit une courbe voisine de celle observée par voie sous-cutanée.

Toutefois la pente est moins marquée, les grosses doses étant, relativement aux petites et toutes proportions gardées, moins actives dans le cas de la voie intestinale.

De façon grossière on peut estimer que le rapport des doses

.../...

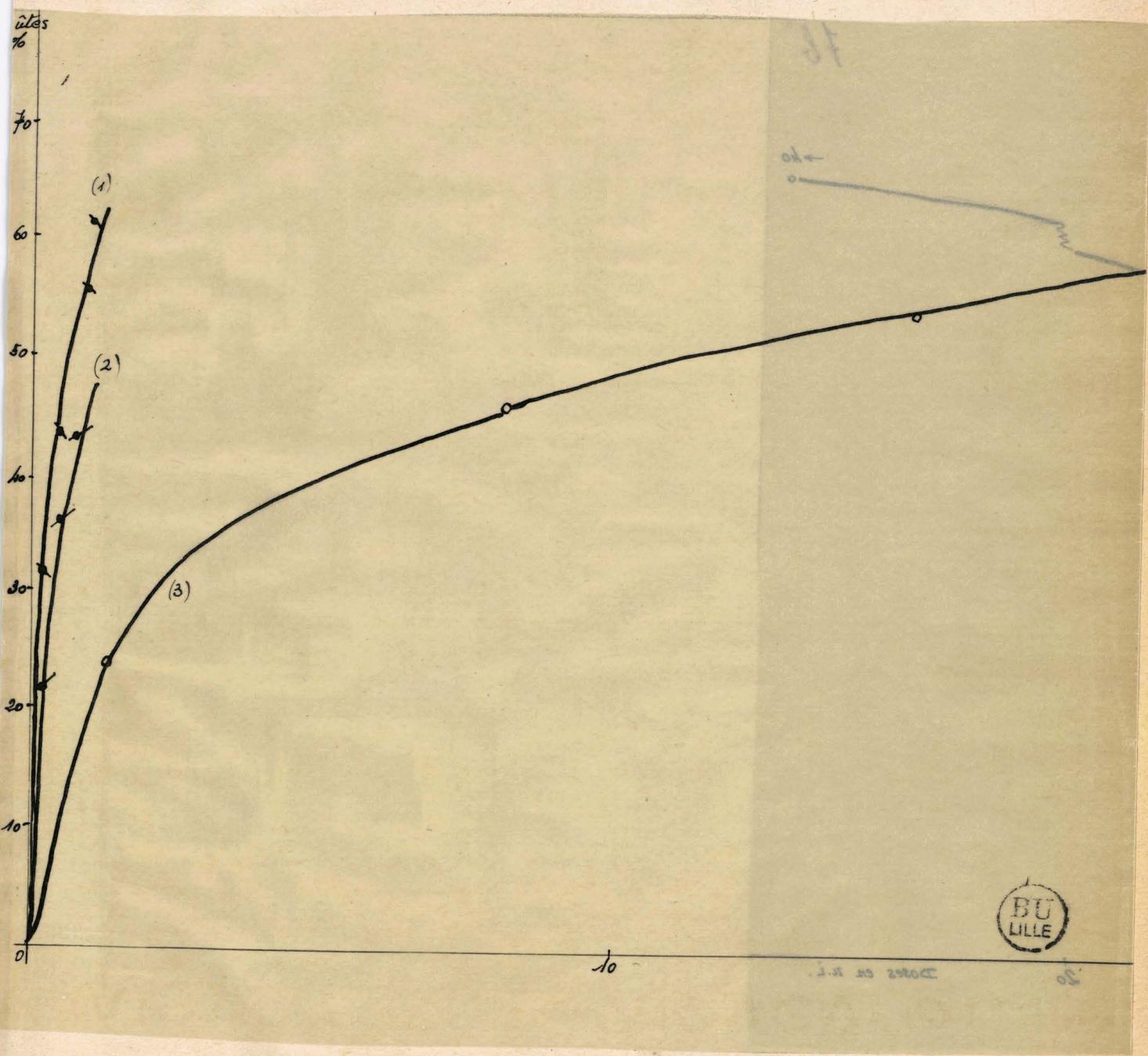
Injection sous-cutanée (GLEY)
" " (MARKS)
Instillation intra-anale.

INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

COURBE D'ACTION / DOSES

Fig. 7 b.

95



BU
LILLE

INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

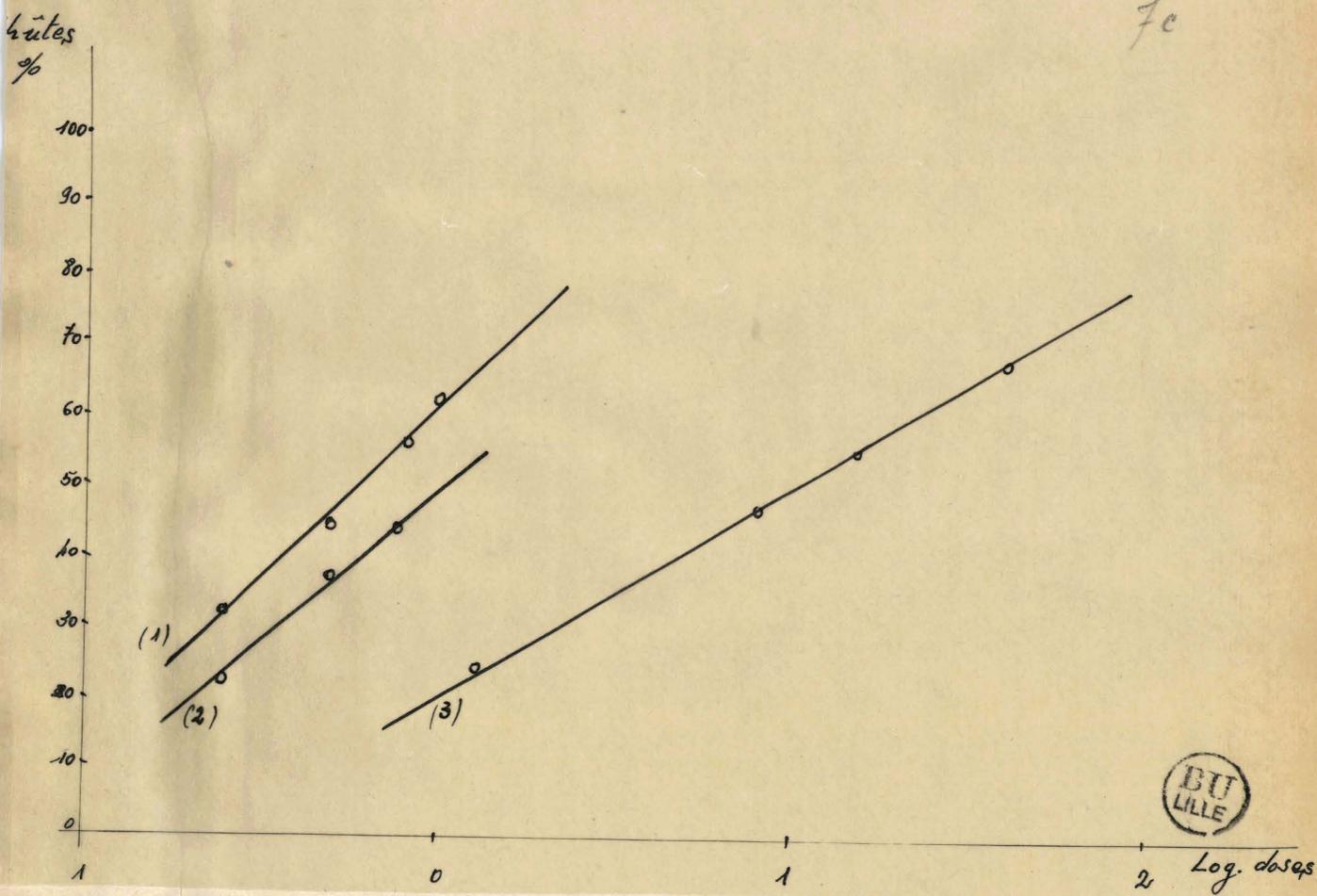
96

- COURBE D'ACTION / Log. doses

-.-.-.-.-

- (1) Injection sous-cutanée (GLEY)
- (2) " " (MARKS)
- (3) Instillation intra-anale.

- Fig. 7 c.



entre la voie sous-cutanée et la voie intestinale est de 1 à 13 ou de 1 à 7,8 suivant qu'on prend les résultats de GLEY ou ceux de MARKS.

5) - INFLUENCE DE LA TRIÉTHANOLAMINE :

Dans cette série d'essais nous avons voulu étudier l'influence que pouvait avoir un corps modifiant la tension superficielle et non toxique par lui-même.

Notre choix s'est porté sur la triéthanolamine, composé miscible dans l'ensemble eau-propylène glycol-terpinéol-insuline, tensio-actif et relativement peu toxique. Nous avons ainsi pu réaliser une solution homogène d'insuline dans ce milieu complexe.

Les essais physiologiques ont été effectués comme d'habitude.

Expérimentation :

- Solutions d'insuline: I.T.P.

et I.T.P. + 10 % triéthanolamine : I.T.P.A

Les deux correspondent à 1 cm³ = 7,5 u.i.

- Animaux : Les courbes d'hypoglycémie ont été faites pour chaque solution (l'une avec, l'autre sans triéthanolamine) sur plusieurs lots de lapins totalisant 34 animaux et croisés de façon à diminuer les variations individuelles.

Résultats :

Courbe N°8.

Conclusions :

Contrairement à ce que nous attendions, la présence de triéthanolamine a atténué l'activité de l'insuline. Diverses explications pouvaient être mises en avant. Nous avons surtout pensé à l'action propre de la triéthanolamine comme d'ailleurs celle du propylène glycol. Cette étude fait l'objet du paragraphe suivant :

6) - ACTION DU PROPYLENE GLYCOL sur la GLYCEMIE :

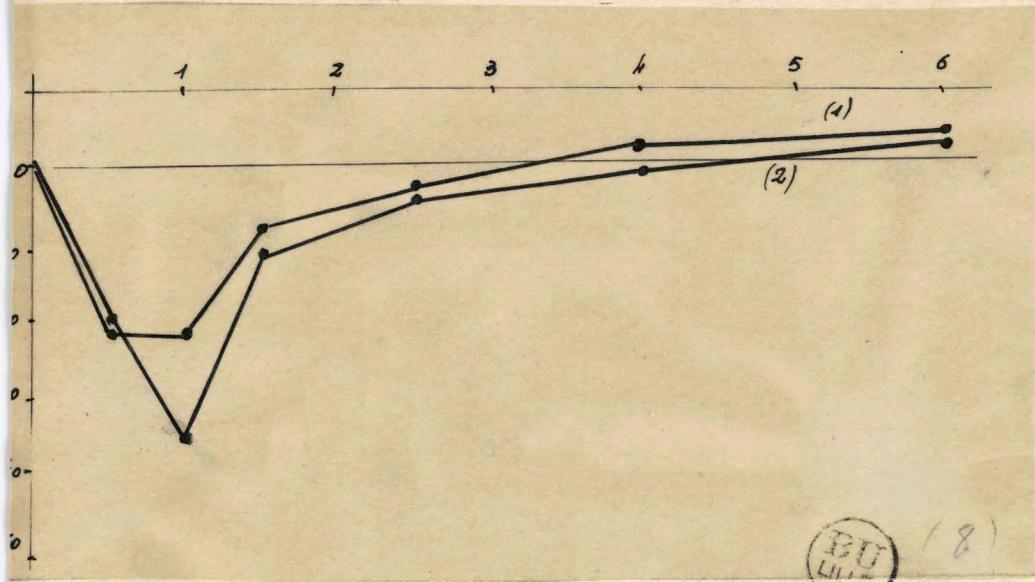
Nous avons traité de la manière habituelle des lots de lapins avec des quantités de propylène glycol/terpinéol égales à celles utilisées dans les expériences précédentes soit de l'ordre de 1 cm³/Kg, par instillation rectale.

Expérimentation :

Produits essayés : Propylène glycol/terpinéol 9:1

Résultats : Courbe N°9.

Fig. 8

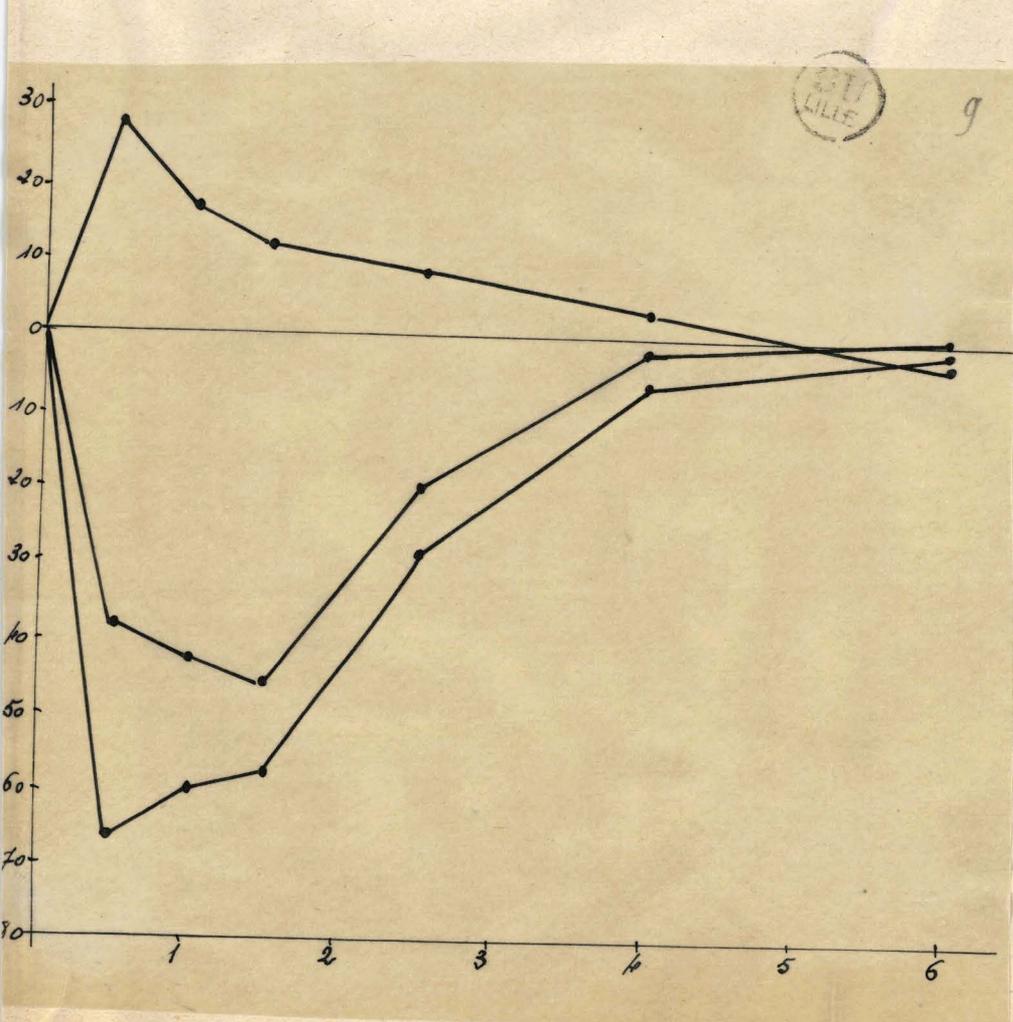


Installation intra-ana-
le.

- 1) I.T.P.A. 7,5ui./kg
17 lapins
- 2) I.T.P. 7,5 ui./kg
17 lapins.



Fig. 9



Instillation intra-
anale.

- (1) Excipient I.P.
1 cm³/Kg.
- (2) I.T.P.
1 cm³ = 8 ui/kg
- (3) = (1) + (2)



30/6/48.

Conclusions :

L'examen de la figure N°9 montre bien l'influence de l'excipient, non seulement sur la flèche d'hypoglycémie mais également sur la forme de la courbe elle-même. Quand on administre l'insuline dissoute dans le mélange propylène-glycol/terpinéol, la chute maximum est atteinte au bout de 1h.1/2 en moyenne et il y a, de façon générale une remontée initiale vers 2h.1/2. Ces deux caractéristiques semblent dues à l'excipient dont l'action hyperglycémisante se superpose à l'action inverse de l'insuline.

Si par conséquent on donnait l'insuline sans propylène-glycol, on devrait observer une chute brutale au bout de 1/2 h. et une remontée normale. Nous verrons plus loin qu'il en est bien ainsi. Cette idée fournira la matière du paragraphe suivant.

II.- EXPERIMENTATION EN MILIEU HETEROGENE.

I)- SUSPENSION EAU-TERPINEOL :

Pour vérifier l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent à savoir que la flèche et l'aire d'hypoglycémie étaient modifiées par l'action propre et superposée du propylène-glycol, nous imaginons l'essai suivant :

Deux séries de lapins sont traitées avec une même dose d'insuline, la première en utilisant le véhicule habituel propylène/terpinéol, la deuxième une simple suspension extemporanée de terpinéol dans l'eau (10 % terpinéol).

Expérimentation :

- Solutions utilisées : (I.E.T.)

- Eau 9 parties
- Terpinéol I partie
- Insuline et HCl N, q.s.p. 1 cm³ = 7,5 u.i.

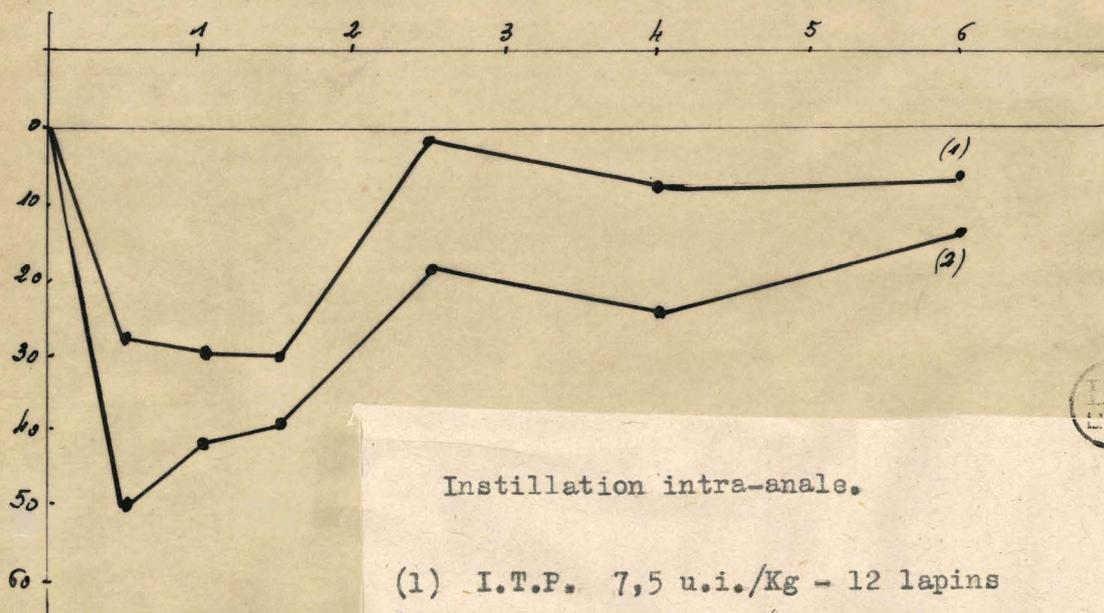
Résultats :

La figure 10 est démonstrative. La suspension eau/terpinéol est nettement plus active.

Un point sur lequel il faut insister est que l'insuline administrée par la voie rectale dans une suspension d'eau-terpinéol a la même action quand à sa rapidité d'action, que si elle était injectée intraveineuse et au rapport des doses près. La chute maximum s'observe au bout de 1/2 heure et la remontée commence à partir de ce moment là.

COMPARAISON I.T.P. et I.T.E.

Fig. 10



Instillation intra-anales.

(1) I.T.P. 7,5 u.i./Kg - 12 lapins

(2) I.T.E. " " - 19 lapins.

10/12/48 .

2)- ETUDE DE L'ACTION DE CORPS TENSIOACTIFS :

La suspension eau/terpinéol 9:1 est très instable. En revanche si l'on incorpore à la suspension des corps tensio-actifs, on obtient facilement des émulsions laiteuses stables.

Il était intéressant d'étudier, dans ces conditions le passage de l'insuline à travers la muqueuse intestinale. D'autant plus qu'en dehors de l'amélioration que l'émulsifiant était susceptible d'amener grâce à la dispersion de l'agent de pénétration, on pouvait en espérer une action propre et directe sur cette pénétration.

D'ailleurs cette propriété des corps tensio-actifs a déjà été utilisée LASH et SCHÖNBRUNNER avaient choisi la saponine (qui jadis avait permis les premières cristallisations de l'insuline).

Plus tard, pour éviter la toxicité et surtout le fort pouvoir hémolytique de ce corps, M.DEROT a expérimenté l'isopropylnaphtalène sulfonate de soude et le lauryl sulfonate de soude. Mais ces composés dont le premier est encore fortement hémolytique ne semblent pas avoir donné les résultats attendus par cet auteur.

Reprenant ce problème, nous avons étudié et comparé l'action de 4 émulsifiants obtenus par condensation de l'oxyde d'éthylène avec l'huile de ricin(x). Pour plus de commodité nous les appellerons ici C_A - C_B - C_T et C₅₄.

Ils ont l'avantage d'être peu toxiques.

Toxicité de C _A :	_____
" " C _B :	_____
" " C _T :	_____
" " C ₅₄ :	_____

Expérimentation :

Nous utiliserons dans cette série d'essais la voie d'administration qui nous paraît la plus régulière, l'installation intrana-

anale. Dans ces conditions nous comparons des suspensions Eau/terpinéol (9:1) contenant les mêmes quantités d'insuline (1 cm³ = 2,5ui) et renfermant des quantités variables d'agent émulsifiant.

Résultats :

Voir courbe N^{os} 11.

.../...

(x) Fabriqués et commercialisés sous le nom de Cémulsol par la Société de produits chimiques et de sculpture de Beyons.

Emulsifiants C_A : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Suspension Eau/terpinéol} \quad 9:1 \\ C_A \quad \quad \quad \quad \quad \quad 5\% \\ \text{Insuline q.s.pour } 1 \text{ cm}^3 = 2,5 \text{ u.i.} \end{array} \right.$

On administre 1 cm³/Kg soit 2,5 u.i./Kg.

Emulsifiant C_B : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Suspension Eau/terpinéol} \quad 9:1 \\ C_B \quad 0,5\% - 5\% - 7,5\% - 10\% - 20\% \\ \text{Insuline q.s.pour } 1 \text{ cm}^3 = 2,5 \text{ u.i.} \end{array} \right.$

On administre 1 cm³/Kg soit 2,5 u.i./Kg.

et 2 cm³/Kg soit 5 u.i./Kg.

Emulsifiant C_T : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Suspension Eau/terpinéol} \quad 9:1 \\ C_T \quad 5\% - 7,5\% - 10\% - 100\% \\ \text{Insuline q.s.pour } 1 \text{ cm}^3 = 2,5 \text{ u.i.} \end{array} \right.$

On administre 1 cm³/Kg soit 2,5 u.i./Kg.

Emulsifiant C_{54} : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Suspension Eau/terpinéol} \quad 9:1 \\ C_{54} \quad \quad \quad \quad \quad \quad 5\% \\ \text{Insuline q.s.pour } 1 \text{ cm}^3 = 2,5 \text{ u.i.} \end{array} \right.$

On administre 1 cm³/Kg soit 2,5 u.i./Kg.

Conclusions :

1° / En comparant C_B et C_T (courbes n°11), on voit que l'hypoglycémie la plus profonde est obtenue avec des teneurs en émulsifiant allant de 5 à 10 %. Au delà l'augmentation du pourcentage ne donne pour ainsi dire plus d'avantages.

2° / Le type d'émulsifiant joue aussi, non pas tant sur l'intensité de la chute que sur la durée de l'hypoglycémie. A ce double point de vue, C_T paraît le plus efficace bien qu'au seul titre de la profondeur, ce soit C_A .

Les courbes n°12 résument ces résultats.

- DISCUSSION GENERALE -

1° / Quand on passe en revue l'ensemble des résultats de cette série d'essais qui portent sur plus de 150 observations, on note les variations considérables qui affectent le franchissement de la barrière intestinale par l'insuline suivant le type de véhicule dans laquelle elle est dissoute.

Fig. 11

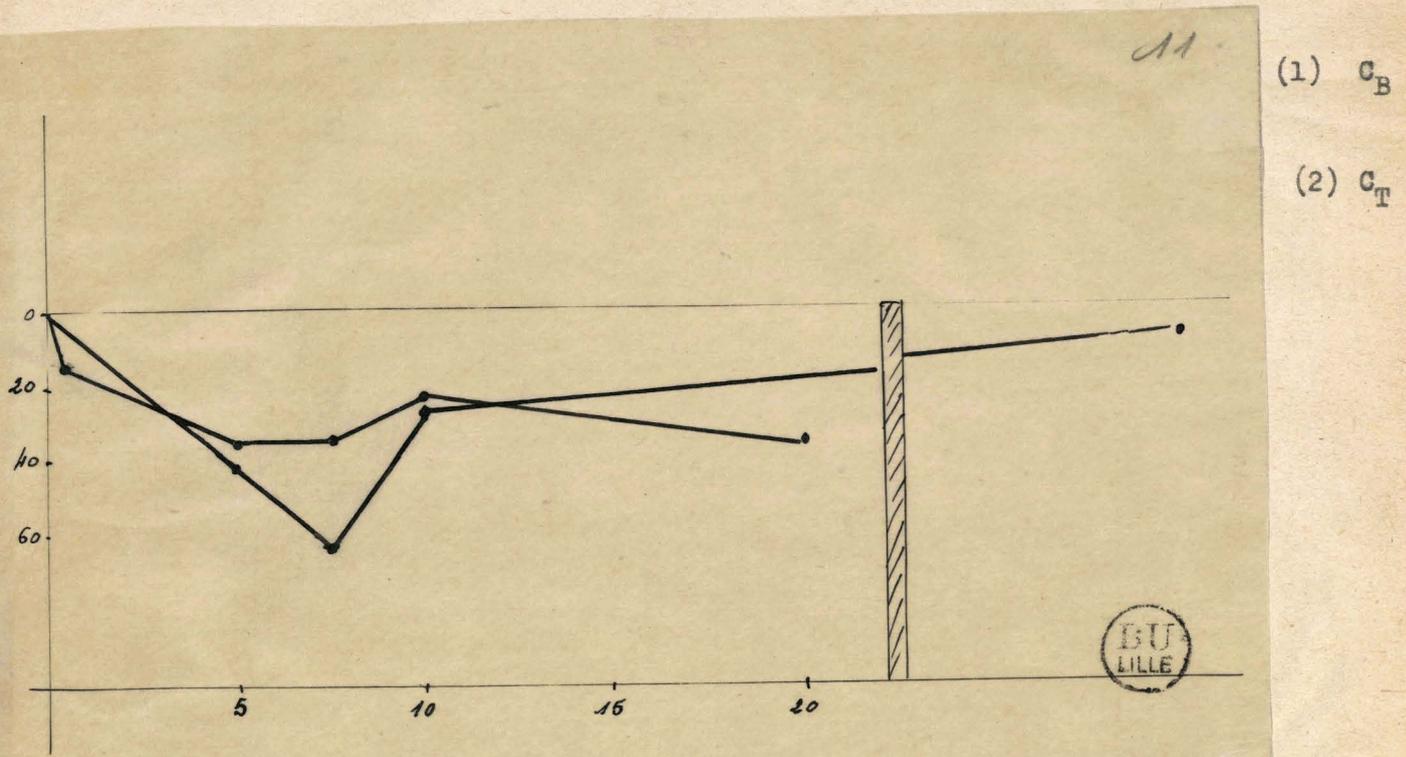
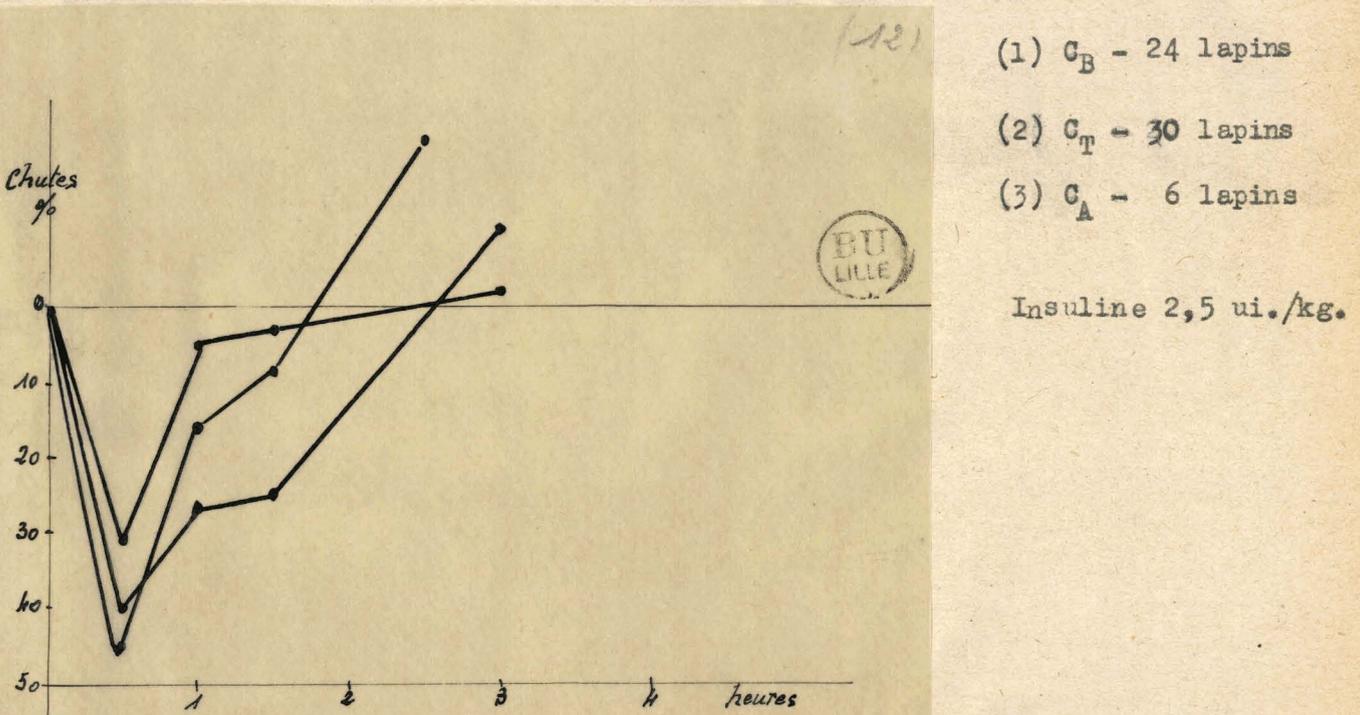


Fig. 12



La figure n°13 donne une idée des différentes valeurs de la pénétration. Alors que des doses de 25 u.i./Kg en solution dans le carbowax donne des chûtes de l'ordre de 30 %, l'addition de terpinéol permet d'atteindre 50 % avec 13 u.i./kg. La forme liquide sans carbowax (terpinéol-eau-polyéthylène glycol) donne 40 à 45 % pour 8 u.i./Kg. L'élimination du propylène glycol, lui-même légèrement hyperglycémiant permet de descendre à 50 % avec 7,5 u.i./Kg.

Enfin la dispersion du terpinéol, améliorant encore les phénomènes de surface améliore encore la pénétration et permet d'obtenir des chûtes de 40 à 45 % avec des doses de 2,5 u.i./Kg seulement (voir aussi Fig. 12).

2°) Pour comparer l'activité de l'insuline quand on l'introduit directement dans l'intestin à celle qu'on observe par les autres voies, il est nécessaire de tenir compte de deux choses :

- d'une part la profondeur de la glycémie n'est pas directement proportionnelle aux doses (voir fig. n°7a et 7b) et
- d'autre part la forme de l'aire d'hypoglycémie variant suivant la voie d'administration, il est difficile de faire des comparaisons très précises.

Nous verrons plus loin l'allure générale des différents types d'aires. Pour chercher quel est le rapport des doses équivalentes d'insuline administrée par voie parentérale et intestinale, nous avons construit les courbes de glycémie après l'injection intraveineuse d'insuline, aux doses de 0,5 u.i./Kg et de 1 u.i./Kg. (Fig. N°14).

En effet l'activité de l'hormone dissoute dans ^{l'acipient Eau} ~~le~~ terpinéol et administrée par instillations intra-anales correspond assez sensiblement à celle de l'injection intraveineuse.

Le maximum d'action est obtenu dès la 1 ère demi-heure, mais l'hypoglycémie remonte rapidement et l'activité a cessé au bout de 3 heures.

Dans ces conditions on obtient une identité d'action pour 2,5 u.i./Kg en instillation intra-anales et 0,5 u.i./Kg en injection intraveineuse, soit 5/1 (Fig. N°14).

Dans certains cas même, le rapport tombe à 4/1 et 3/1.

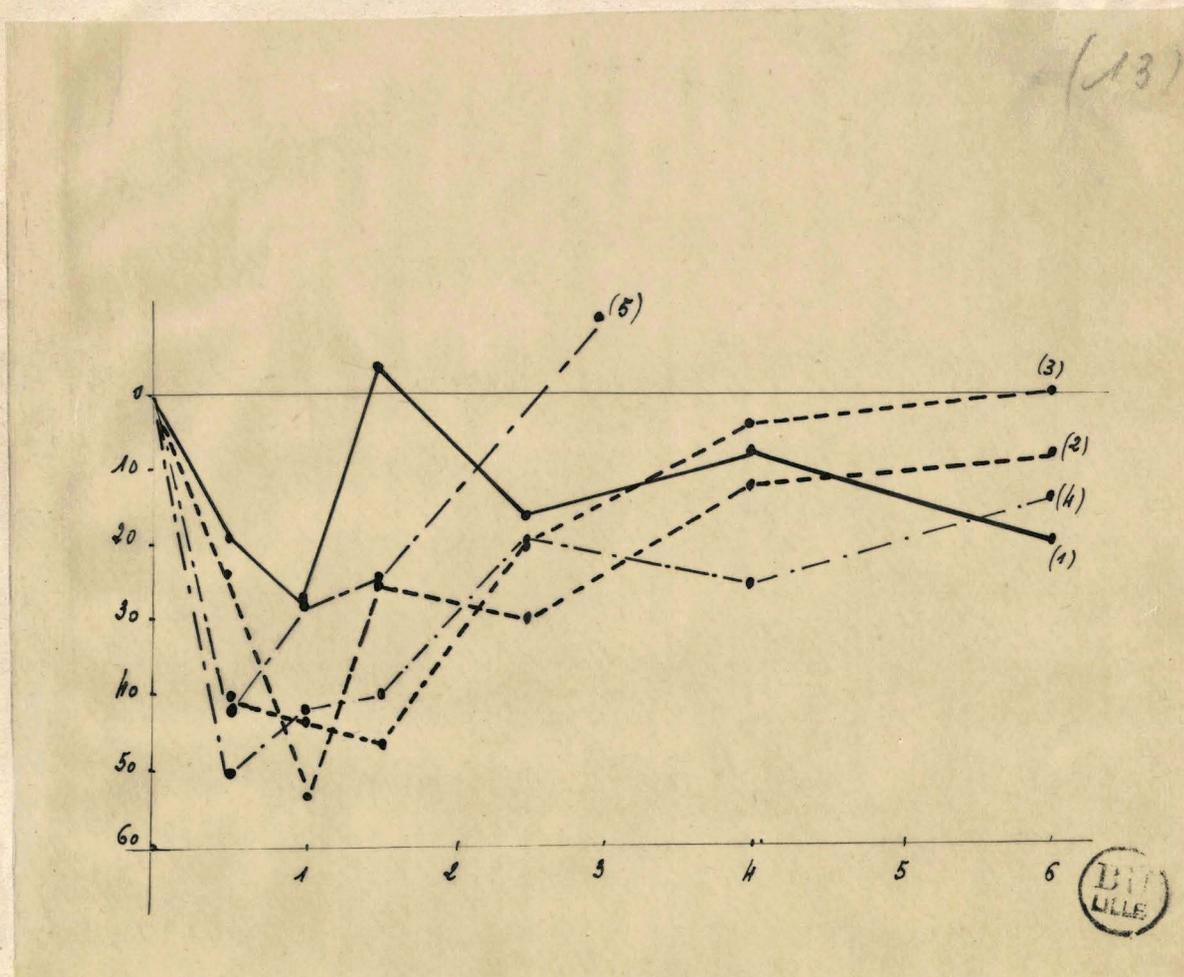
- CONCLUSIONS -

VUE D'ENSEMBLE DES ACTIVITES DE L'INSULINE SUIVANT LA VOIE D'ADMINISTRATION :

Nous avons vu que le rapport Activité intraveineuse est de Activité intra-anales

INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

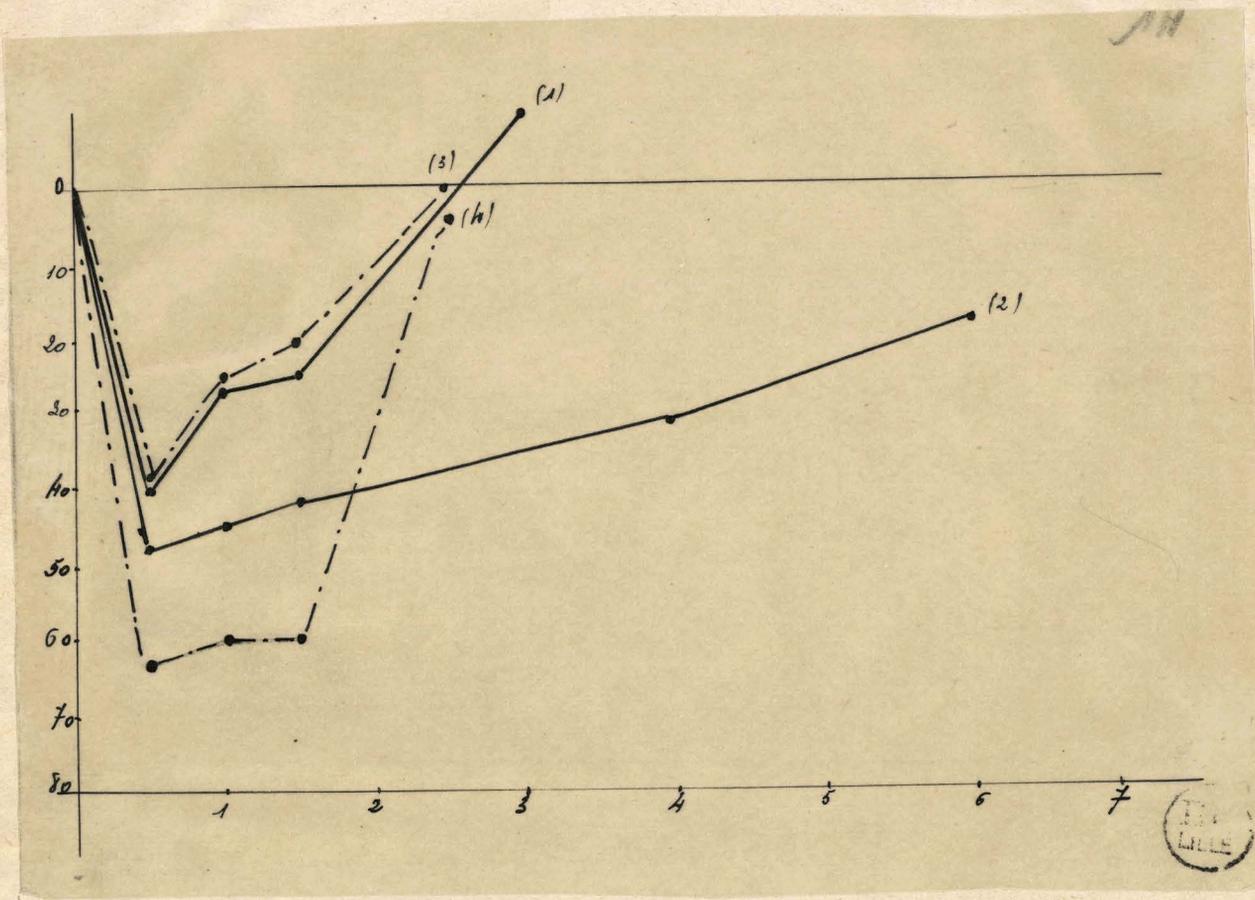
Fig. 13



- (1) - I.C.P.- 25 u.i./kg
 (2) - I.C.T.P.13 "
 (3) - I.T.P. 8 "
 (4) - I.T.E. 7,5 "
 (5) - I.T.E.C_T 2,5 "

INSULINE PAR LA VOIE DIGESTIVE

Fig. 14



- (1) - I.T.E. C_T - 2,5 u.i./Kg
- (2) - I.E.T. - 7,5 "
- (3) - I en I/V - 0,5 "
- (4) - I en I/V - 1 "

107

1/3 à 1/5 dans nos dernières expériences, là où nous avons associés l'action du terpinéol comme agent de pénétration et ^{celle} d'un émulsifiant.

Il est à remarquer que malgré nos efforts nous n'avons pas pu descendre plus bas bien que ce rapport soit un des meilleurs obtenus jusqu'ici.

On peut se demander pourquoi ? Deux raisons sont possibles. Ou bien une partie importante de l'insuline est détruite, ou bien le type même d'administration ne permet pas de meilleur résultat à cause du passage dans la veine porte vers le foie.

La première hypothèse paraît la plus mince à cause de la rapidité avec laquelle l'action hypoglycémisante apparaît. Celle-ci est maximum entre 20 et 30 minutes, ce qui signifie que l'hormone passe très rapidement à travers la membrane intestinale.

D'autre part, si l'on en croit les travaux de l'insuline serait détruite assez lentement dans l'intestin. Par conséquent cette destruction serait seulement marquée quand le séjour y est prolongé comme c'est le cas avec les premiers véhicules quand nous avons essayés.

La deuxième hypothèse paraît être plus sérieuse. L'insuline passant de l'intestin dans la circulation portale arrive au foie puis seulement après avoir franchi cette nouvelle barrière dans la circulation générale. Elle a, au cours de ce long trajet beaucoup de chance d'y être en partie détruite.

Une démonstration partielle à cette idée est fournie par la différence importante d'action entre l'injection sous-cutanée et l'injection intraveineuse, que ce soit avec l'insuline pure ou avec l'insuline-zinc-protamine, celle-ci étant pourtant à action retardée (Fig. N°15 et Fig. N°16).

L'action par voie intraveineuse est très rapide mais beaucoup plus fugace, l'insuline y est détruite, soit neutralisée ou éliminée plus rapidement, même quand elle est engagée sous forme d'un complexe pourtant stable au pH du sang.

Quoiqu'il en soit, il n'est pas étonnant que, ^{même} introduite rapidement à travers la muqueuse intestinale dans la veine porte puis franchissant la barrière hépatique pour repasser dans la circulation générale, elle y subisse une perte d'activité importante.

Le thème de ce petit tableau, qui appartient un moment à Renoir, a été pris chez les Vénitiens, peut-être par le truchement d'un élève de Poussin ; cependant, il est conçu dans une autre humeur. Les bacchantes de la Renaissance combinent les scènes amoureuses, les plaisirs du vin et la danse, ce sont des images de gaieté et de joyeux délassements. Le tableau de Cézanne représente un combat, la violence de l'amour et même le viol. Ce ne sont pas les idylliques nus païens de la mythologie grecque mais une fantaisie moderne, semblable à son solennel Déjeuner sur l'herbe. Le nombre des personnages accroît la violence, il la rend aussi plus naturelle ; c'est l'acte de tous les hommes, ce n'est pas l'attentat d'un seul individu.

Cette composition est plus simple et plus claire que celle des bacchantes du Titien ou de Poussin ; les quatre groupes de nus sont distincts et isolés les uns des autres, mais ils s'apparentent en formant une danse ininterrompue de lignes richement incurvées. Les corps en lutte réapparaissent dans les nuages en mouvement, dans les arbres agités, diffusant ainsi dans toute la nature leur passion et leur énergie. Le tourbillon des formes a une animation baroque. Tout bouge : les personnages, les arbres, les nuages, le sol, le chien. C'est la furie et l'ivresse du désir.

Un passage d'une lettre de Cézanne à Zola, écrite en 1878, parlant du nouveau livre de son ami : *une Page d'amour*, et remarquant sa supériorité sur son précédent ouvrage, *l'Assommoir*, s'applique parfaitement à ce tableau : « ... les lieux par leur peinture sont imprégnés de la passion qui agite les personnages, et, par là, font plus corps ensemble avec les acteurs, et sont moins désintéressés dans le tout. Ils semblent s'animer pour ainsi dire et participer aux souffrances des êtres vivants ».

A ce stade de son art, le sujet représente pour Cézanne non pas son thème essentiel, mais une idée à part qu'il peut néanmoins matérialiser avec une remarquable facilité, comme s'il s'agissait d'un sujet familier. Rarement le jeu du pinceau est aussi sûr et aussi fluide. Les deux arbres à gauche sont une trouvaille fascinante ; silhouettes fourchues opposées — métaphore des personnages debout et renversés — reliées par une branche. Cette peinture d'imagination montre la force d'inspiration de la composition chez Cézanne, sa capacité de trouver des formes expressives quand la nature n'est pas devant lui pour le stimuler et le guider. Ses sensations puissantes sont aussi une source ; le mouvement vital dans ces corps, comme l'élaboration du paysage, vient du plus profond de lui-même. Mais, si l'on compare cette toile avec une version antérieure, toute proche dans le temps, on voit ce que l'œuvre de Cézanne doit à sa propre critique. Beaucoup d'éléments ont été modifiés, un très grand pas a été fait vers la forme finale ; pourtant celle-ci semble parfaitement spontanée et libre.

