**RECHERCHES
SUR L'UTILISATION PHYSIOLOGIQUE DU CALCIUM
AU COURS DE LA CROISSANCE CHEZ LE RAT.
NOUVEAUX ASPECTS DU ROLE BIOLOGIQUE
DE LA VITAMINE D**

PAR

Jean CAUSERET

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction. — Origine et plan du présent travail

PREMIÈRE PARTIE

**L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME CALCIQUE CHEZ LE RAT
PAR LA MÉTHODE DES BILANS**

CHAPITRE PREMIER

Les animaux d'expérience.

CHAPITRE II

Les régimes alimentaires.

CHAPITRE III

Conduite d'une étude de métabolisme.

DEUXIÈME PARTIE

**INFLUENCE DE LA TENEUR EN CALCIUM
DU RÉGIME ALIMENTAIRE SUR L'ASSIMILATION
DU CALCIUM CHEZ LE JEUNE RAT**

CHAPITRE IV

**Influence de la teneur en calcium du régime alimentaire
sur l'assimilation du calcium en l'absence de Vitamine D.**

CHAPITRE V

**Influence du taux calcique alimentaire sur l'assimilation
du calcium en présence de Vitamine D.**

TROISIÈME PARTIE

ÉVOLUTION DU POUVOIR DE FIXATION DU CALCIUM AVEC L'ÂGE

CHAPITRE VI

**Influence de l'âge sur l'assimilation du calcium
chez le jeune rat en fonction du taux calcique alimentaire.**

QUATRIÈME PARTIE

**TENEUR EN CALCIUM DU RÉGIME ALIMENTAIRE
ET RACHITISME EXPÉRIMENTAL**

CHAPITRE VII

Taux calcique alimentaire et rachitisme expérimental.

CINQUIÈME PARTIE

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES BESOINS CALCQUES DU RAT
AU COURS DE LA CROISSANCE**

CHAPITRE VIII

Besoins en calcium du jeune rat.

CHAPITRE IX

Besoins calciques au cours de la croissance chez le rat et chez l'homme.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS**BIBLIOGRAPHIE**

INTRODUCTION

ORIGINE ET PLAN DU PRÉSENT TRAVAIL

L'importance du calcium dans la nutrition minérale des animaux supérieurs et de l'homme est reconnue depuis longtemps. C'est en effet entre 1840 et 1850 que BOUSSINGAULT a réalisé chez diverses espèces de mammifères et d'oiseaux les premiers bilans calciques, et qu'il a attiré l'attention sur les grandes quantités de calcium fixées dans le tissu osseux au cours de la croissance.

Mais c'est surtout au cours des cinquante dernières années que le métabolisme calcique a fait l'objet d'un grand nombre de travaux : la répartition du calcium dans l'organisme, son rôle physiologique, les lois qui régissent son absorption, les mécanismes de son dépôt dans l'os, de sa mobilisation et de son excrétion, l'influence des glandes endocrines et de divers facteurs alimentaires sur son métabolisme, l'utilisation physiologique du calcium des aliments, l'évaluation des besoins calciques d'entretien et de croissance, constituent autant de problèmes qui, depuis la fin du XIX^e siècle, n'ont jamais cessé de figurer au premier plan des préoccupations des nutritionnistes, et à l'étude desquels certains chefs d'école comme SHERMAN et MITCHELL ont, avec leurs collaborateurs, consacré une large part de leur activité.

Si l'on essaie de dégager aujourd'hui les grands traits de la physiologie du métabolisme global et du métabolisme intermédiaire du calcium, on constate cependant qu'il existe encore, à côté de nombreux points acquis, des incertitudes graves et parfois surprenantes, notamment en ce qui concerne les lieux de l'absorption et les voies d'excrétion du calcium, les processus biochimiques de la calcification osseuse et l'utilisation physiologique du calcium alimentaire.

Sur ce dernier point — particulièrement important aux yeux du nutritionniste — les travaux ne manquent pas : mais les résultats expérimentaux divergent à un degré tel, qu'il est souvent impossible d'en tirer des conclusions nettes. Si, par exemple, il est bien établi que le calcium de certains aliments naturels (lait, nombreux végétaux chlorophylliens, carotte) est remarquablement bien utilisé par l'organisme alors

que d'autres aliments (grains de céréales entiers, épinard, cacao) n'en sont que des sources très médiocres, il reste impossible de chiffrer cette utilisation avec quelque précision, comme on peut le faire par exemple pour la valeur biologique des aliments protéiques : quelle valeur attribuer au coefficient de rétention du calcium d'un aliment, lorsque les estimations des divers expérimentateurs s'échelonnent entre 20 et 90 p. 100 ou même plus ? S'il s'agit de sels calciques purs, la confusion des données expérimentales est plus grande encore : les divers classements établis jusqu'ici chez l'homme ou chez les animaux d'après le degré d'utilisation du calcium contenu dans ces sels apparaissent inconciliables, et il n'est pas rare même qu'ils soient inversés presque complètement les uns par rapport aux autres.

Sur bien des points, l'influence de l'équilibre alimentaire sur l'utilisation physiologique du calcium n'est guère mieux connue. Les protéines, les lipides, le magnésium, l'acide citrique et l'acide lactique accroissent-ils les pertes calciques de l'organisme ou favorisent-ils au contraire la rétention du calcium ? Il existe en faveur des deux opinions des arguments expérimentaux valables, entre lesquels aucun choix n'est à proprement parler possible.

Ces incertitudes grèvent évidemment d'une lourde hypothèque toutes les recherches qui ont été consacrées jusqu'ici à la détermination du besoin alimentaire de calcium chez l'homme ou chez les animaux, puisque ces recherches sont basées, pour une large part, sur l'évaluation des quantités de calcium retenues normalement dans l'organisme et sur celle du degré moyen d'utilisation du calcium alimentaire. Sous l'accord apparent des chiffres avancés par les nutritionnistes et les zootechniciens, règne en réalité la plus grande incertitude : d'ailleurs, certains physiologistes ne se privent pas de critiquer ces chiffres en soulignant que l'organisme peut subsister dans de bonnes conditions avec un apport alimentaire de calcium beaucoup plus réduit.

C'est en 1945 que, sur le conseil de Mme J. RANDOIN, Directeur du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, et en collaboration avec elle, nous avons commencé à nous intéresser à ces problèmes. Frappés par l'importance des divergences qui viennent d'être rappelées, nous avons entrepris d'en rechercher les causes essentielles.

Tout d'abord, nous avons repris l'étude de l'influence de fortes doses de magnésium sur le métabolisme calcique. Il existe en effet sur cette question une bibliographie spécialement abondante, dans laquelle on peut relever les conclusions les plus contradictoires. Pour de nombreux expérimentateurs, un excès de magnésium entraîne un accroissement très marqué de l'élimination fécale et urinaire du calcium ; pour d'autres, à peine moins nombreux, le même excès améliore l'utilisation du calcium

alimentaire ; quelques-uns enfin n'observent aucune modification de la rétention calcique en fonction des quantités de magnésium administrées.

L'analyse approfondie de tous ces travaux nous a montré que leurs auteurs se sont placés dans des conditions expérimentales très variées, notamment en ce qui concerne la nature et les doses des sels magnésiens utilisés, leur voie d'introduction dans l'organisme, la composition et tout particulièrement l'équilibre phospho-calcique des régimes alimentaires, l'âge et le degré de calcification des sujets d'expérience. Cependant, l'un des facteurs qui semblaient les plus variables était la teneur en calcium de l'alimentation. Nous avons donc décidé de travailler sur des animaux soumis à des régimes de taux calciques très variés.

Les résultats de nos recherches n'ont été publiés qu'en partie [112, 113, 115]. Ils montrent que l'effet de fortes doses de magnésium sur le métabolisme du calcium, chez le jeune Rat, dépend essentiellement du taux calcique alimentaire. Si ce taux est peu élevé (par exemple 100 à 200 mg p. 100 g d'aliments secs), un supplément quotidien de 80 à 200 mg. de magnésium sous forme de chlorure augmente nettement la vitesse de croissance, le poids du fémur et du tibia et la teneur de ces os en calcium ; dans les mêmes conditions, le magnésium exerce un léger effet antirachitique décelable sur radiographie des os de la patte. Mais lorsque le taux calcique du régime s'accroît, l'effet favorable du magnésium sur la croissance et sur le développement osseux devient de moins en moins marqué, et finit même par s'inverser : en effet, lorsque la teneur du régime en calcium atteint des valeurs très élevées (par exemple 1 000 mg p. 100 g d'aliments secs), le même supplément de magnésium diminue nettement la vitesse de croissance et réduit le développement du fémur et du tibia, ainsi que leur teneur en calcium. Avec des suppléments de magnésium plus considérables (jusqu'à 500 mg p. 100 g de régime, toujours sous forme de chlorure), l'inversion de l'effet du magnésium est encore plus nette : il y a réduction de la vitesse de croissance dès que le taux calcique du régime atteint 200 mg p. 100 g.

Si, à la lumière de ces résultats, on revoit l'ensemble des travaux consacrés jusqu'ici à d'autres problèmes controversés, on constate que, dans tous les cas, les variations du taux calcique alimentaire sont considérables, et l'on en vient à penser qu'elles suffisent peut-être à expliquer bien des divergences.

Partant de cette constatation, nous avons d'abord songé à reprendre systématiquement l'étude de l'influence d'un certain nombre d'autres facteurs alimentaires sur le métabolisme calcique, en fonction de la teneur en calcium du régime. Mais à la réflexion, il nous est apparu qu'il était préférable d'étudier d'abord l'influence du taux calcique alimentaire sur l'utilisation même du calcium, en essayant d'en tirer quelques conclusions relatives à la notion de besoin calcique.

C'est cette idée qui est au point de départ des recherches exposées dans le présent travail.

Le plan de ces recherches est simple.

La *première partie* constitue un exposé technique relatif à l'étude du métabolisme calcique chez le Rat par la méthode des bilans. Si ancienne que soit cette méthode, — nous avons vu que BOUSSINGAULT l'utilisait déjà il y a plus d'un siècle — son utilisation en nutrition expérimentale n'a jamais fait l'objet d'un exposé d'ensemble : nous avons cru utile de combler cette lacune, en signalant à cette occasion toutes les précautions à prendre en ce qui concerne le choix des sujets, la mise au point des régimes alimentaires et la conduite même de l'expérimentation, pour que la précision des résultats obtenus atteigne un maximum.

Cette étude technique nous a amené à aborder quelques problèmes particuliers, relatifs notamment à l'influence de l'eau sur l'élimination fécale et urinaire du calcium, et aux variations quotidiennes du bilan calcique chez le Rat.

La *seconde partie* est consacrée à l'étude de l'influence du taux calcique alimentaire sur l'utilisation physiologique du calcium chez de jeunes rats soumis à un régime pourvu ou non de vitamine D.

Les études métaboliques sur lesquelles sont basées les recherches précédentes sont de très courte durée : elles concernent le métabolisme global du calcium à un stade bien déterminé de la croissance, chez des animaux qui étaient soumis auparavant à un même régime. Mais on peut penser que le pouvoir de fixation du calcium varie avec l'âge, et que l'organisme est capable de s'adapter progressivement à des régimes très pauvres ou très riches en calcium en réglant sa rétention calcique à des valeurs plus élevées ou plus basses. D'où une nouvelle série de recherches, qui font l'objet de la *troisième partie*, dans laquelle l'utilisation physiologique du calcium est étudiée en fonction de deux variables : le taux calcique alimentaire et le temps.

La *quatrième partie* est une brève étude de l'influence du taux calcique alimentaire sur le développement du rachitisme expérimental : elle complète les résultats des précédentes au moyen d'un nouveau test.

Enfin, dans la *cinquième partie*, nous essayons de clarifier la notion de « besoin calcique de croissance » en confrontant les résultats des études métaboliques rapportées antérieurement et d'autres critères employés chez les mêmes sujets, puis de donner une expression chiffrée de ce besoin chez le Rat. De plus, nous dégageons, des résultats expérimentaux de nos recherches sur le Rat, quelques idées et quelques faits qui peuvent aider à mieux poser le problème des besoins calciques de l'enfant, ou qui en éclairent certains aspects.

PREMIÈRE PARTIE

**L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME CALCIQUE CHEZ LE RAT
PAR LA MÉTHODE DES BILANS****TECHNIQUES UTILISÉES DANS LE PRÉSENT TRAVAIL
RECHERCHES PRÉLIMINAIRES**

Chapitre premier

LES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE

Le Rat albinos est l'animal le plus désigné pour les études de métabolisme par la méthode des bilans, en particulier pour les recherches qui portent sur le métabolisme du calcium.

En effet, c'est un animal qui se reproduit vite et dont l'élevage est relativement peu coûteux, ce qui permet de travailler simultanément sur un grand nombre de sujets de même souche. Il est peu fragile. Ses besoins nutritifs sont mieux connus que ceux de la plupart des autres espèces. Enfin, contrairement à d'autres mammifères utilisés couramment au laboratoire (Cobaye, Lapin, Chien), il consomme sans aucune difficulté des régimes synthétiques présentés sous forme de farine ou de bouillie. La Souris présente les mêmes avantages, mais sa taille beaucoup plus petite rend difficile la réalisation d'études métaboliques précises et ne permet guère d'adjoindre à ces dernières les études de croissance qui, dans bien des cas, peuvent utilement les compléter.

Ces raisons suffisaient pour que nous fixions notre choix sur le Rat. Il y en a eu cependant encore une autre. C'est que la plupart des recherches sur le métabolisme du calcium qui n'ont pas été effectuées sur l'Homme lui-même ont porté sur le Rat. Lorsqu'on utilise cet animal, il est donc plus facile de comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres expérimentateurs.

**I. — CHOIX DES ANIMAUX :
SOUCHE, SEXE, AGE, POIDS CORPOREL, ETC...**

Dans la plupart des expérimentations sur animaux, il est nécessaire de travailler sur des sujets de souche déterminée, de même sexe, d'âges

et de poids corporels voisins : les études de bilans ne font évidemment pas exception à cette règle très générale.

Dans toutes les expériences rapportées dans ce travail, nous avons utilisé des *Rats Wistar*.

En ce qui concerne le *sexe*, ne pouvant travailler simultanément sur des mâles et sur des femelles, nous avons accordé la préférence aux premiers. En effet, les recherches très complètes de SHERMAN et collab. [17, 130] ont montré que le Rat mâle fixe, au cours de sa croissance une quantité de calcium plus élevée que la femelle, surtout à partir du troisième mois de la vie. Des faits assez voisins ont d'ailleurs été observés pour d'autres espèces animales : Souris (BENDANA-BROWN et BROWN [8]), Mouton (MITCHELL [100]), Poulet (MITCHELL, CARD et HAMILTON [101]), etc... Il nous a donc semblé préférable de travailler sur le sexe qui retient les quantités de calcium les plus élevées, de manière que les différences d'utilisation calcique observées entre les divers lots soient aussi importantes que possible.

L'âge et le *poids corporel* des sujets d'expérience sont des facteurs dont il est indispensable de tenir le plus grand compte, car le pouvoir de fixation du calcium n'est pas constant pendant toute la durée de la croissance active du Rat. Cette importante question fera l'objet de la troisième partie de notre travail. Nous nous contenterons ici de souligner que la connaissance du poids corporel des animaux ne suffit généralement pas pour établir des lots homogènes, surtout si l'on travaille sur des sujets dont la croissance est déjà assez avancée : en effet, le temps nécessaire pour qu'un certain nombre de rats soumis à un même régime alimentaire atteignent un poids déterminé, est variable d'un animal à un autre. Il est donc utile de tenir compte à la fois de l'âge des animaux et de leur poids corporel.

Cependant, même lorsqu'on est en possession d'un lot de rats homogène en ce qui concerne la souche, l'âge et le poids corporel, il est utile de vérifier, au cours d'une courte période précédant la mise en expérience, que le gain de poids de tous les animaux est du même ordre de grandeur. Nous n'y avons jamais manqué dans toutes les expériences décrites dans ce travail.

Pour réduire le plus possible l'importance des variations individuelles, il peut être utile de tenir compte des *portées* auxquelles appartiennent les divers sujets utilisés. Il est indispensable de le faire lorsqu'on étudie le métabolisme calcique en dosant le calcium dans l'organisme entier au début et à la fin d'une expérience : dans ce cas, en effet, la quantité de calcium retenue est calculée par différence entre celles qui sont dosées à ces deux stades, chez des animaux différents. Bien que cette précaution ne soit pas indispensable lorsqu'on utilise la méthode des bilans, on la prend chaque fois qu'on le peut. Nous n'avons pas cherché à le faire dans les

recherches qui seront exposées plus loin, car le nombre de lots à comparer entre eux était beaucoup trop élevé.

II. — NOMBRE D'ANIMAUX

Pour comparer l'effet de divers régimes sur le métabolisme calcique par la méthode des bilans, le procédé le meilleur consiste à soumettre successivement les *mêmes animaux* à chacun de ces régimes : on peut ainsi travailler sans inconvénients sur un petit nombre de sujets. Malheureusement, ce procédé, applicable si les animaux sont en équilibre de poids et sensiblement en équilibre calcique — ce qui suppose qu'on leur laisse le temps de s'y remettre entre deux phases successives d'une même expérience —, ne l'est plus lorsque les animaux sont en pleine croissance.

Dans ce cas, on est obligé de comparer l'effet des divers régimes étudiés sur autant de lots d'animaux.

Le nombre de sujets nécessaire dépend du soin apporté à la constitution des divers lots d'animaux. Si l'on tient compte tout à la fois de l'âge des sujets, de leur poids corporel, de leur vitesse de croissance et de leur consommation spontanée de nourriture, ce nombre peut ne pas être très élevé. Dans les recherches qui font l'objet de la 2^e partie de ce travail, nous avons dû nous contenter d'utiliser des lots de 4 rats seulement : on verra que la précision des résultats obtenus n'en est pas moins satisfaisante.

III. — ALIMENTATION DES ANIMAUX AVANT LA MISE EN EXPÉRIENCE

Il faut accorder une grande attention à la manière dont les animaux destinés à une étude de bilan ont été nourris avant la mise en expérience. En effet, l'état de nutrition d'un organisme, et plus particulièrement son état de calcification, peuvent exercer une influence considérable sur la rétention calcique au cours des premiers temps de l'expérience. Chez le Rat comme chez d'autres espèces, le passage brusque d'un régime pauvre en calcium à un régime riche peut entraîner momentanément une rétention calcique anormalement élevée (DANIELS et collab. [33] ; FAIRBANKS et MITCHELL, [40] ; MACY [96] ; NICOLAYSEN [107b]). Inversement, le passage d'un régime riche en calcium à un régime pauvre peut s'accompagner d'un abaissement marqué de la rétention qui dure plus ou moins longtemps (HUNSCHER et collab. [68] ; ROTTENSTEN [121] ; KRAUT et WECKER [78] ; WALKER, FOX et IRVING [156]).

Pour éviter cet écueil, il suffit de n'utiliser que des sujets soumis depuis le sevrage à un même régime d'élevage moyennement riche en calcium.

Les deux séries d'animaux employés dans les recherches qui font

l'objet de notre travail provenaient d'élevages alimentés de manière uniforme depuis plusieurs générations.

Voici la composition centésimale des deux provendes correspondantes :

Provende n° 1. — Farine de blé entière, 65 ; tourteau de lin, 7 ; farine de luzerne, 2 ; cretons de viande, 20 ; foie séché, 2 ; levure de bière sèche, 3 ; carbonate de calcium, 0,5 ; chlorure de sodium, 0,5.

Provende n° 2. — Farine de blé entière, 51,5 ; farine de maïs entière, 3 ; germe de blé, 6 ; tourteau d'arachide, 5 ; farine de luzerne, 5 ; mélasse, 3 ; lait écrémé en poudre, 10 ; farine de viande, 4 ; farine de poisson, 3 ; levure de bière sèche, 6 ; poudre d'os, 1 ; huile de foie de morue, 1,5 ; chlorure de sodium, 1.

Dans ces deux provendes, nous avons dosé (*tableau I*) : l'azote par microkjeldahl ; le *phosphore* par le procédé de COPAUX [28] ; le *calcium* par la méthode de GUILLAUMIN [59, 60] ; le *fer* par la méthode de LAVOLLAY [83] ; la *thiamine* après oxydation en thiochrome [6] ; la *riboflavine* par la méthode *fluorimétrique* [6] ; le *carotène* et la *vitamine A* par la méthode colorimétrique de RAOUL et JANOT [117].

TABLEAU I
Analyse des deux Provendes.

	Provende n° 1	Provende n° 2
	p. 100 g	p. 100 g
Protides (N $\times$ 6,25) (g).....	25,9	21,4
Phosphore (mg).....	227	660
Calcium (mg).....	330	856
Fer (mg).....	23	28,5
Thiamine (mg).....	200	441
Riboflavine (mg).....	333	255
Carotène (mg).....	221	538
Vitamine A (mg).....	143	501

On voit que les caractéristiques des deux Provendes sont assez différentes.

Chapitre II

LES RÉGIMES ALIMENTAIRES

On pourrait penser que, de tous les stades d'une étude métabolique effectuée chez le Rat, la préparation des régimes alimentaires est l'un de ceux qui posent le moins de problèmes techniques ⁽¹⁾. Dans leurs comptes-

(1) Chez l'homme, l'emploi de régimes semi-artificiels, de composition connue, est rendu difficile par le manque de sapidité de ces régimes : joint à la monotonie de l'alimentation, ce manque de sapidité engendre un sentiment de dégoût qui se traduit, quelquefois à bref délai, par une réduction de la quantité de nourriture consommée. Aussi l'expérimentateur est-il généralement contraint de faire figurer dans ces régimes des aliments naturels et d'y introduire une certaine variété, ce qui complique son travail et risque d'affecter plus ou moins la précision des résultats obtenus.

rendus d'expériences, la plupart des auteurs qui utilisent cette méthode se bornent, d'ailleurs, à indiquer la composition des régimes utilisés et leur forme de présentation.

Cependant, nous pensons qu'on ne saurait accorder trop d'attention à cette question. La précision des résultats obtenus dans une étude métabolique — souvent même leur signification — en dépend pour une large part : c'est du moins ce que nous voudrions montrer ici, en étudiant successivement les problèmes posés par la présentation des régimes, le choix de leurs constituants et leur mode de préparation.

I. — PRÉSENTATION DES RÉGIMES.

Le choix du mode de présentation des régimes alimentaires conditionne celui de certains de leurs constituants, aussi bien que leur mode de préparation : c'est donc lui qui retiendra le premier notre attention.

Le régime doit être présenté de manière telle, que les animaux ne puissent pratiquement pas le gaspiller, ce qui fausserait la détermination des ingesta et rendrait délicate la récolte des excréta.

Cette nécessité suffit à faire éliminer tout régime *en poudre*, que le Rat tend à saisir avec ses pattes et qui peut adhérer à son museau, avant de se mêler aux fèces et à l'urine. Aucun type de mangeoire ne permet de supprimer ces difficultés. Le meilleur est sans nul doute la mangeoire à orifice circulaire vertical de faible diamètre, suffisamment profonde pour que l'animal soit obligé d'y introduire la tête presque entièrement sans avoir la possibilité d'y faire pénétrer en même temps les pattes antérieures. Nous avons vérifié que ce type de mangeoire n'empêche pas le gaspillage.

Quelques expérimentateurs ont adopté autrefois un autre type de présentation : le *petit pain* cuit après mélange du régime avec une quantité d'eau convenable. Bien plus encore que le précédent, ce mode de présentation est à déconseiller. Il permet un gaspillage très important, surtout si les grilles qui constituent le fond des cages à métabolisme sont à larges mailles — ce qui est souhaitable si l'on veut éviter la consommation des fèces ; de plus, il arrive que l'animal urine sur les pains.

La présentation du régime sous forme de *bouillie liquide* permet d'éviter cet inconvénient : si un régime ainsi présenté est distribué dans des mangeoires assez profondes à orifice vertical de faible diamètre, le gaspillage garde un caractère exceptionnel. Il arrive que certains sujets essayent systématiquement de prendre la nourriture avec les pattes pour ne pas avoir à introduire la tête dans la mangeoire. Mais ils restent peu nombreux, et ce sont toujours les mêmes : on peut donc les éliminer si l'on prend la précaution de soumettre, pendant quelques jours, aux régimes que l'on veut employer, plus de rats que l'on ne désire en garder

pour l'expérience. Ajoutons que de petites quantités de bouillie peuvent adhérer au museau, mais l'animal a toujours tendance à les faire disparaître complètement en les léchant.

L'emploi de régimes présentés sous forme de bouillie nous a toujours donné les meilleurs résultats, à condition que cette bouillie soit suffisamment liquide. Si elle est trop consistante, la plupart des animaux tendent à la saisir avec les pattes et de petits morceaux de pâte peuvent se mêler aux fèces et à l'urine.

D'ailleurs, le Rat préfère très nettement les bouillies liquides : comme le montre l'expérience suivante, une augmentation appréciable de la consistance du régime se traduit, presque toujours, par une diminution de la quantité de nourriture consommée.

EXPÉRIENCE. — Dix rats blancs de sexe mâle, pesant de 180 à 190 g, sont répartis en 2 lots de 5 sujets.

Durant une première semaine, ces 2 lots reçoivent des régimes alimentaires équilibrés, de composition identique ⁽¹⁾, préparés dans les deux cas en faisant cuire à feu doux deux parties de mélange sec avec une partie d'eau. Les régimes ne diffèrent l'un de l'autre que par le degré de cuisson : le régime du lot I est peu cuit et reste suffisamment fluide pour s'écouler très facilement, alors que celui du lot II est cuit plus longtemps et a une consistance suffisante pour que l'on puisse retourner les mangeoires qui le contiennent sans qu'il s'écoule.

Durant une seconde semaine, les 2 lots sont soumis au régime liquide réservé auparavant au seul lot I.

On trouvera, ci-dessous, les valeurs des consommations de nourriture individuelles et moyennes des 2 lots de rats durant les deux semaines de l'expérience (en grammes de nourriture sèche par jour).

Lot I		1 ^{re} semaine	2 ^e semaine
		(en g)	(en g)
Rat n° 1		14,08	11,50
— n° 2		14,72	12,17
— n° 3		13,37	12,60
— n° 4		17,05	12,20
— n° 5		15,21	14,49
Moyennes		14,89	12,61
Lot II			
Rat n° 6		11,12	11,15
— n° 7		12,00	12,37
— n° 8		15,18	13,58
— n° 9		14,99	12,36
— n° 10		12,88	12,51
Moyennes		13,23	12,39

En dépit des variations individuelles de l'appétit, on voit que, durant la première semaine, les animaux du lot II (régime consistant)

⁽¹⁾ Caséine, 18 ; huile d'arachide, 9 ; amidon de froment, 44 ; saccharose, 24 ; mélange salin sans calcium, 2 ; carbonate de calcium, 1 ; agar-agar, 2 ; vitamines hydrosolubles et liposolubles. Voir page 285 la composition des mélanges vitaminiques.

consomment moins de nourriture que ceux du lot I (régime fluide). La différence observée est bien due à la consistance plus grande du régime du lot II puisque, durant la deuxième semaine, l'appétit moyen des animaux des deux lots, qui reçoivent tous le régime fluide, est pratiquement le même.

Il convient donc d'utiliser de préférence des régimes liquides et surtout, lorsqu'on effectue des recherches comparatives avec plusieurs régimes, de veiller à ce qu'ils aient tous la même consistance.

II. — COMPOSITION DES RÉGIMES

Les régimes doivent être convenablement équilibrés, notamment en ce qui concerne les éléments qui peuvent exercer une influence sur le métabolisme calcique : protides, lipides, phosphore, magnésium, fer, vitamine D, etc... ⁽¹⁾.

D'autre part, il est toujours souhaitable de disposer d'un régime de base pauvre en calcium, et d'y introduire ce dernier élément sous une forme connue : de cette manière, il est plus facile de répéter une expérience et d'en comparer les résultats avec ceux d'autres recherches.

Les considérations développées dans ce chapitre conduisent aux conclusions suivantes :

— les constituants du régime ne doivent pas être trop riches en calcium ;

— ils doivent permettre de préparer une bouillie liquide et homogène, ne contenant pas trop d'eau (*Voir plus loin*).

1^o Protides

En dehors des aliments naturels (viande, lait), les seules sources de protides couramment utilisées en nutrition expérimentale sont la caséine, l'ovalbumine et la peptone pancréatique.

Au taux de 18 p. 100 (par rapport au régime sec), la *caséine* assure, chez le jeune Rat, une croissance excellente et une rétention azotée normale. Son seul inconvénient est de contenir parfois une quantité assez importante de calcium provenant du lait. Cependant, il existe des caséines commerciales qui n'en sont pas exagérément chargées, comme l'indiquent les résultats de quelques dosages pratiqués, durant 2 ans, sur plusieurs livraisons provenant d'un même établissement (voir ci-dessous). En cas de nécessité, on peut d'ailleurs recourir à différentes techniques de purification.

(1) Voir à ce sujet SHERMAN [127], RANDOIN et CAUSERET [114].

	Calcium (mg p. 100 g)
Caséine commerciale.....	262,0
— — — — —	217,2
— — — — —	199,1
— — — — —	197,1
— — — — —	190,0
Caséine lavée à l'alcool (BYLA)	75,9
— — — — —	69,6
— — — — —	25,0

Au contact de l'eau, les particules de caséine gonflent, parfois dès la température ordinaire : elles peuvent donc contribuer à donner à un régime la consistance et l'homogénéité recherchées.

Comme aliment azoté, l'*ovalbumine* présente les mêmes avantages que la caséine. De plus, elle est toujours pauvre en calcium, puisque le blanc d'œuf en contient fort peu. Voici d'ailleurs les résultats de trois analyses qui ont porté sur des échantillons de même provenance :

	Calcium (mg p. 100 g)
Ovalbumine cristallisée	54,4
— — — — —	49,1
— — — — —	46,4

Malheureusement, le prix de revient élevé de l'ovalbumine suffit, en général, à la faire écarter.

La *peptone pancréatique*, si souvent utilisée par ailleurs, ne saurait généralement convenir pour un bilan calcique. En effet, les peptones du commerce contiennent presque toujours une quantité considérable de calcium. Nous n'avons pu trouver qu'une seule fois une peptone qui en soit pauvre :

	Calcium (mg p. 100 g)
Peptone pancréatique Codex (Établ. A)	2.343
— — — — —	2.323
— — — — —	1.900
— — — — —	1.708
— — — — — (Établ. B)	4.893
— — — — — (Établ. C)	108

On est donc conduit pour diverses raisons à accorder la préférence à la caséine, pourvu que l'on dispose d'un échantillon de cette substance qui ne contienne pas trop de calcium : il est alors indiqué d'en stocker une quantité suffisante pour la durée des expériences prévues. Ce choix présente d'ailleurs l'avantage de faciliter les comparaisons expérimentales, car la plupart des recherches sur le métabolisme calcique paraissent avoir été effectuées avec des régimes renfermant de la caséine comme seule source d'azote.

2° Lipides

Les *huiles raffinées* (huile d'arachide, huile d'olive), doivent être préférées au beurre et à la graisse de beurre. Leur introduction dans un

régime est en effet plus aisée ; de plus, elles présentent l'avantage d'être exemptes à peu près totalement de vitamine D, aussi bien que de calcium.

Nous avons vérifié biologiquement l'absence d'activité antirachitique de ces deux huiles en les introduisant, au taux de 10 p. 100, dans le régime rachitigène de L. RANDOIN et LÉCOQ [116], et en soumettant de jeunes rats de 40 g. durant 3 semaines, aux deux nouveaux régimes ainsi constitués : la radiographie de la zone fémoro-tibio-rotulienne des animaux à la fin de l'essai a montré un élargissement des cartilages de conjugaison pratiquement identique à celui de rats témoins soumis, durant le même temps, au régime rachitigène normal.

Nous utilisons, par conséquent, l'une de ces deux huiles — de préférence l'huile d'arachide, moins coûteuse — au taux de 10 p. 100.

3° Glucides

Les glucides habituellement employés comme constituants des régimes pour animaux (amidon, dextrines, saccharose, glucose) renferment généralement peu de calcium. Nous en avons trouvé les quantités suivantes dans trois d'entre eux :

	Calcium (mg p. 100 g)
Amidon de froment	64,0
— — — — —	23,1
— — — — —	20,0
— — — — —	19,4
— — — — —	17,5
Saccharose (Établ. A)	30,8
— — — — —	9,0
— — — — —	8,2
— — — — —	6,4
— — — — — (Établ. B)	38,5
— — — — — (Établ. C)	29,3
Glucose anhydre	35,5
— — — — —	6,8

Cependant, l'emploi de certains glucides peut présenter des inconvénients. Ainsi, celui des *dextrines* est à déconseiller, bien qu'il permette de préparer des régimes de consistance parfaite : il arrive, en effet, qu'elles provoquent une diarrhée qui rend la récolte des fèces difficile et qui risque de modifier les conditions de l'absorption intestinale des constituants du régime, en particulier du calcium.

Par contre, un mélange de proportions convenables d'amidon et de sucres (saccharose ou glucose) ne présente que des avantages : il n'absorbe qu'une quantité d'eau raisonnable au cours de la cuisson, permet d'obtenir des régimes parfaitement homogènes et assure un transit intestinal normal. Pratiquement, dans des mélanges qui contiennent une quantité normale de glucides (65 à 70 p. 100), nous associons habituellement l'amidon au saccharose dans les proportions approximatives de 2 à 1.

4^o Mélange salin

Le choix du mélange salin présente une importance toute particulière, puisque de nombreux minéraux (chlore, phosphore, magnésium, fer, etc...) influent sur le métabolisme du calcium. Or, tandis que les protides, les lipides et les glucides figurent dans les innombrables « formules » de régimes alimentaires normaux pour animaux de laboratoire à des taux assez voisins, les quantités des éléments minéraux contenues dans les mélanges salins les plus courants varient entre des limites très éloignées. C'est là un fait très regrettable, qui peut expliquer pour une part certaines divergences de résultats expérimentaux dans l'étude du métabolisme calcique.

Pour notre part, nous utilisons depuis longtemps le mélange salin de HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN pour les raisons suivantes :

- c'est l'un des plus complets ;
- il figure parmi ceux qui sont le plus couramment utilisés à l'heure actuelle ;
- sa préparation est aisée et rapide.

Nous rappelons ici la composition de ce mélange, en g par kg [66].

Carbonate de calcium	543
Phosphate monopotassique	212
Chlorure de potassium	112
Chlorure de sodium	69
Carbonate de magnésium	25
Phosphate ferreux	20,5
Sulfate de magnésium	16
Fluorure de sodium	1
Sulfate de cuivre	0,9
Sulfate de manganèse	0,35
Alun de potassium	0,17
Iodure de potassium	0,08

HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN signalent que, contrairement à ce qui se fait pour les autres mélanges salins, leur mélange peut être introduit dans des régimes pour Rat à des taux inférieurs à 4 p. 100 : à des taux compris entre 2 et 3,5 p. 100, il donnerait des résultats excellents. Après quelques essais préliminaires, nous nous sommes arrêté à la solution suivante : dans un régime normal, nous introduisons 2 p. 100 de mélange salin de HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN *privé de carbonate de calcium* (sel qui représente 54 p. 100 du poids de ce mélange) et nous y ajoutons une quantité de carbonate de calcium calculée de manière à assurer le taux calcique désiré ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Pour de simples raisons de commodité, nous remplaçons le phosphate ferreux du mélange (20,5 p. 1 000) par du citrate ferrique ammoniacal (27,3 p. 1 000). La quantité de fer ainsi introduite est inchangée.

5^o Vitamines

L'emploi de produits naturels (levure sèche, huiles de foie de poissons) comme sources de vitamines n'est pas à recommander.

En effet, comme le montrent les chiffres suivants, la levure sèche du commerce renferme une quantité appréciable de calcium :

	Calcium (mg p. 100 g)
Levure sèche en poudre	350,0
— — —	337,7
— — —	335,9
— — —	137,2

D'autre part, il est difficile de se procurer des huiles de foie de poissons d'activité vitaminique A et D parfaitement standardisées, et il est souvent nécessaire de travailler avec des régimes dépourvus de vitamine D.

Pour toutes ces raisons, il est préférable d'introduire, dans les régimes, les vitamines à l'état cristallisé ou en solution pure.

En ce qui concerne les vitamines du groupe B, nous utilisons habituellement la formule suivante :

	Par kg de régime
Thiamine	2 mg
Riboflavine	3 mg
Amide nicotinique	50 mg
Pyridoxine	2,5 mg
Pantothénate de calcium	10 mg

En solution dans une petite quantité d'eau distillée, ce mélange vitaminique est introduit dans les régimes après cuisson. Bien qu'il ne contienne pas tous les facteurs du groupe B, il nous donne toute satisfaction : pour vérifier qu'il est suffisant, nous avons d'ailleurs suivi durant 18 mois des animaux qui le recevaient depuis le moment du sevrage, et constaté que leur évolution pondérale, ainsi que leur comportement et leur aspect général, demeuraient absolument normaux.

Quant aux vitamines liposolubles, nous les introduisons dans le régime aux taux suivants :

	Par kg de régime
Acétate d'axérophтол	1 000 U.I.
Vitamine D ₃	3 000 U.I.
α-tocophérol	15 mg
Vitamine K hydrosoluble	1 mg

Les vitamines A, D et E sont mises en solution dans une petite quantité d'huile, et la vitamine K hydrosoluble est ajoutée à la solution hydrique de vitamines B.

6^o Aliment de lest

Au cours d'une étude métabolique, il n'est pas possible de distribuer aux animaux du *papier filtre*, dont les débris se mêleraient aux excréta.

L'incorporation de papier désagrégué au régime cuit est réalisable : mais, même de cette manière, les animaux le rejettent sous forme de petites boulettes.

Il est donc préférable d'utiliser l'*agar-agar* en poudre qui, au taux de 2 p. 100 dans le régime sec, assure un transit intestinal normal. Malheureusement, l'apport de calcium qui en résulte est plus important que celui du papier filtre. Alors que ce dernier n'en contient que 400-450 mg p. 100 g, voici les valeurs que nous avons obtenues en analysant différents échantillons d'*agar-agar* :

			Calcium (mg p. 100 g)
Agar-agar en poudre	(Établ. A)		994
—	(Établ. B)		1 276
—	(Établ. C)		794
—	(Établ. D) ⁽¹⁾		702
—	—	(1)	572
—	—	(1)	467

Comme dans le cas de la caséine, il est bon, lorsqu'on a pu se procurer un échantillon d'*agar-agar* relativement peu riche en calcium, d'en réserver à l'avance une quantité suffisante pour la durée des expériences envisagées.

III. — TAUX D'HYDRATATION DES RÉGIMES. INFLUENCE DE LA CONSOMMATION D'EAU SUR L'ÉLIMINATION INTESTINALE ET RÉNALE DU CALCIUM

Un mélange sec de composition déterminée peut être associé à une quantité d'eau très variable.

Il est donc intéressant de se demander dans quelle mesure la quantité d'eau ainsi ingérée — à laquelle se joint l'eau consommée directement comme boisson — influe sur la quantité de calcium perdue par l'organisme. BRULL et collab. [21] ont déjà attiré l'attention sur le problème en montrant chez le Chien que la polyurie provoquée par intubation de volumes d'eau importants, s'accompagne d'une augmentation de l'excrétion calcique rénale. Se basant sur cette constatation, JACQUOT et collab. [70] recommandent d'éviter que les animaux ne boivent trop.

En raison de son intérêt théorique et de l'importance qu'il présente pour la réalisation d'études métaboliques précises, nous avons repris l'étude de ce problème. Pour cela, nous avons déterminé l'élimination intestinale et l'élimination rénale du calcium, chez de jeunes rats soumis à un même régime alimentaire, associé à des quantités d'eau variables. De plus, nous avons utilisé l'occasion qui s'offrait pour rechercher la proportion de la quantité totale d'eau ingérée qui provient du régime et celle qui est prise directement sous forme de boisson, ainsi que l'in-

(1) Spécifications différentes.

fluence du taux d'hydratation du régime sur la quantité d'eau de boisson consommée spontanément.

EXPÉRIENCE. — Seize jeunes rats blancs du sexe mâle, pesant de 80 à 130 g, sont répartis en 3 lots comprenant respectivement 5 ou 6 sujets. Ces 3 lots sont soumis à un régime alimentaire, préparé avec des quantités d'eau différentes.

La composition centésimale du régime sec est la suivante :

Caséine commerciale	18
Huile d'arachide ⁽¹⁾	9
Amidon de froment	44
Saccharose	24
Mélange salin de HUBBEL et coll., sans CO ₃ Ca	2
Carbonate de calcium	1
Agar-agar	2
Vitamines du groupe B ⁽²⁾	

Ce mélange contient 0,474 p. 100 de calcium, dont 0,4 p. 100 sous forme de carbonate de chaux introduit volontairement.

La cuisson des régimes destinés aux 3 lots d'animaux est réalisée au moyen des quantités d'eau indiquées ci-dessous :

Lot I :	500 g p.	1 000 g de mélange sec.	
Lot II :	1 300 g	—	—
Lot III :	2 000 g	—	—

L'étude métabolique commence 3 jours après la mise en expérience et dure 10 jours au total ; elle est conduite de la manière décrite dans le chapitre III du présent travail.

On en trouvera les résultats essentiels dans les tableaux II et III. Dans ce dernier tableau, nous avons réuni un certain nombre de chiffres calculés à partir de ceux qui figurent dans le tableau II, en posant conventionnellement égales à 100 les valeurs expérimentales moyennes obtenues dans le cas du lot I. Certaines comparaisons en sont facilitées et une objection possible se trouve immédiatement écartée : mieux que celui du tableau II, l'examen du tableau III montre que les variations de l'excrétion calcique des trois lots ne s'expliquent nullement par des différences dans les quantités de calcium ingérées.

Les chiffres cités dans les colonnes 2, 3 et 4 du tableau II montrent que, pour tous les lots, la quantité d'eau fournie aux animaux par le régime est plus importante que celle qui est consommée sous forme de boisson. A ce point de vue, il est intéressant de remarquer que, si l'accroissement du taux d'hydratation du régime entraîne une réduction spontanée de la quantité d'eau de boisson consommée, cette réduction n'est pas aussi importante qu'on eût pu s'y attendre : ainsi, elle atteint seulement un tiers chez les animaux du lot III, auxquels leur régime fournit pourtant, à lui seul, deux fois plus d'eau que les sujets du lot I en ingèrent au total.

⁽¹⁾ Additionnée de 1 p. 100 d'une huile de foie de morue (titrant 2.000 U.I. de vitamine A et 500 U.I. de Vitamine D par cm³), et de 0,015 p. 100 d' α -tocophérol.

⁽²⁾ Voir plus haut la composition du mélange vitaminique.

TABLEAU II

Influence de la quantité d'eau ingérée sur l'élimination et sur l'assimilation du calcium (bilans de 10 jours).

Lots	Consommation d'eau			Bilan calcique					Coefficient de rétention (2)	
	Eau du régime (1)	Eau de boisson	Eau totale	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca total excrété	Ca retenu		
	cm ³	cm ³	cm ³	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	Erreur prob.
<i>Lot I:</i>										
Rat 1	67	42	109	550,7	250,5	3,65	254,1	296,6	53,9	
Rat 2	67	56	123	562,7	274,8	3,54	278,3	284,4	50,5	
Rat 3	60	60	120	588,1	265,9	2,20	268,1	320,0	54,4	
Rat 4	72	52	124	592,0	240,6	4,00	244,6	347,4	58,9	
Rat 5	74	53	127	605,4	283,3	5,80	289,1	316,3	52,2	
Moyennes..	70	52	122		263,0	3,84			54,0	0,94
<i>Lot II:</i>										
Rat 6	165	46	211	568,0	272,0	7,58	279,6	288,4	50,8	
Rat 7	172	40	212	590,0	275,2	7,18	282,4	307,6	52,1	
Rat 8	173	62	235	595,1	366,6	6,96	373,0	222,1	37,3	
Rat 9	175	26	201	601,1	386,0	6,32	392,3	208,8	34,7	
Rat 10	176	26	202	604,8	292,2	7,98	300,2	304,6	50,4	
Moyennes..	172	40	212		318,4	7,20			46,1	2,39
<i>Lot III:</i>										
Rat 11	246	27	273	561,9	339,5	12,78	343,3	218,6	38,8	
Rat 12	260	31	291	592,3	234,6	12,05	246,6	345,7	58,5	
Rat 13	260	36	296	593,3	352,3	13,92	366,2	227,1	38,2	
Rat 14	271	51	322	617,0	362,7	10,73	373,4	243,6	39,5	
Rat 15	273	28	301	623,6	332,3	8,25	340,5	283,1	45,4	
Rat 16	277	38	315	631,7	470,6	13,89	484,5	147,2	23,3	
Moyennes..	265	35	300		349,1	11,94			40,6	3,11

(1) Y compris l'eau des constituants du mélange sec. (2) $\frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca ingéré}} \times 100$.

TABLEAU III

Valeurs relatives de la consommation d'eau et des quantités de calcium ingérées et éliminées

Lots	Consommation d'eau	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire
I	100	100	100	100
II	174	102	121	187
III	246	104	133	311

L'animal soumis à un régime alimentaire dont le taux d'hydratation est exagérément élevé, paraît incapable d'abaisser suffisamment sa consommation d'eau de boisson pour que l'effet de compensation qui en résulte présente quelque efficacité.

On voit d'autre part (tableaux II et III) que, conformément aux faits déjà signalés par BRULL et collab., l'ingestion d'une quantité d'eau importante peut entraîner un accroissement très net de l'élimination urinaire du calcium : par rapport au lot I, celle-ci est sensiblement doublée pour le lot II et triplée pour le lot III. Compte tenu des variations individuelles de l'excrétion urinaire du calcium à l'intérieur de chaque lot, il semble que la quantité de calcium perdue par l'urine et la quantité d'eau ingérée varient, chez le Rat, de manière assez comparable.

Mais la perte fécale de calcium peut augmenter elle aussi lorsque la quantité d'eau ingérée s'accroît exagérément. En valeur relative, l'augmentation n'est pas aussi marquée que celle de la perte urinaire (tableau III) : cependant, l'effet de cette augmentation sur la valeur du coefficient de rétention est de beaucoup la plus importante, puisque le calcium fécal représente ici de 97 à 99 p. 100 du calcium excrété au total. Il en résulte que le coefficient de rétention du calcium est nettement abaissé chez les animaux qui ingèrent des quantités d'eau excessives : le calcul des erreurs probables montre que l'abaissement observé est significatif ⁽¹⁾.

Sur le plan pratique, on peut conclure des résultats de cette expérience qu'un régime pour étude de bilan ne doit pas être trop riche en eau. Pour toutes les recherches qui seront exposées dans la suite de ce travail, nous avons adopté le même taux d'hydratation : 500 g d'eau pour 1 kg de mélange sec. C'est là, à peu de chose près, le taux minimum qui permet d'obtenir des régimes homogènes et de consistance encore liquide.

IV. — PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉGIMES

Dans toutes les recherches qui font l'objet du présent travail, nous avons utilisé le régime alimentaire suivant :

Caséine commerciale	18
Huile d'arachide	2
Amidon de froment	40 à 45 ⁽²⁾
Saccharose	24
Mélange salin de HUBBEL et coll., sans CO ₃ Ca ...	2
Carbonate de calcium	0 à 5
Agar-agar	2
Vitamines hydrosolubles et liposolubles.	

Pour préparer 3 kg de régime humide (soit 2 kg de mélange sec et 1 l d'eau distillée), on commence par faire un mélange homogène avec tous

⁽¹⁾ Les erreurs probables du tableau II (dernière colonne) ont été calculées par la formule E.P. = $\frac{2}{3} \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$ où $\bar{x}$ est la moyenne arithmétique des valeurs individuelles, et n le nombre d'animaux.

⁽²⁾ Suivant la teneur en carbonate de calcium du régime.

les produits en poudre, dans une capsule en tôle émaillée d'une contenance de 3 litres. Tout en remuant avec une spatule en bois, on ajoute peu à peu la majeure partie de l'eau distillée nécessaire (980 cm^3), le reste (soit 20 cm^3), étant réservé pour la dissolution des vitamines hydrosolubles, qui ne doivent être incorporées au régime qu'après la cuisson.

Le mélange est cuit à feu très doux sans que l'on cesse à aucun moment de remuer. Lorsqu'il est parvenu à la consistance voulue, on le laisse refroidir. On ajoute alors l'huile d'arachide, dont une petite quantité (5 g) est réservée pour la dissolution des vitamines liposolubles. Les solutions vitaminiques sont enfin incorporées au régime ⁽¹⁾. Ce dernier doit être alors parfaitement homogène.

Dès qu'il est terminé, le régime est versé dans un bocal en verre fermant hermétiquement et il est stocké dans un réfrigérateur à $5^{\circ}\text{--}6^{\circ}$, où il se conserve facilement de 10 à 15 jours.

Nous signalons une difficulté à laquelle nous nous sommes parfois heurté. Certains régimes se prennent en masse très rapidement au cours de la cuisson et deviennent compacts en refroidissant : sous cette forme, ils sont inutilisables.

La recherche systématique du constituant du régime responsable de ce phénomène nous a permis de constater qu'il s'agissait de la caséine, dont certains échantillons ne se prêtent pas au mode de préparation décrit plus haut. Avec ces échantillons, il suffit d'abandonner à 15° le mélange de régime sec et d'eau pendant 12 à 15 heures, sans l'avoir fait chauffer. Après ce laps de temps, le régime a pris une consistance convenable. Le seul inconvénient du procédé est que le régime garde moins bien son homogénéité que lorsqu'il est cuit : chaque jour, on constate à sa surface la formation d'une phase aqueuse de faible épaisseur, ce qui oblige à l'homogénéiser de nouveau. Dans les mangeoires, le même fait se produit si le régime y demeure plus de 24 heures.

Chapitre III

CONDUITE D'UNE ÉTUDE DE MÉTABOLISME

Le soin apporté au choix des animaux et à l'établissement des régimes alimentaires ne suffit pas pour que les résultats d'une étude métabolique soient parfaitement valables. Il faut encore que cette étude soit conduite de manière à permettre la détermination précise des quantités de calcium ingérées et excrétées et qu'elle dure pendant un temps suffisant pour que les variations quotidiennes de l'appétit et de l'excrétion fécale et urinaire n'influent pas de manière trop marquée sur les résultats.

⁽¹⁾ La composition de ces solutions est indiquée p. 285.

I. — NÉCESSITÉ D'UNE PÉRIODE PRÉPARATOIRE

Avant de commencer l'expérience, il est souhaitable de soumettre les animaux pendant quelques jours aux régimes qui leur sont destinés en déterminant quotidiennement la quantité de nourriture consommée.

Cette période préparatoire permet :

- d'habituer les animaux à leur nouveau régime ;
- d'éliminer des sujets dont la vitesse de croissance ou la consommation de nourriture est anormale ;
- d'éliminer, le cas échéant, des sujets qui tendent à gaspiller.

La nécessité d'habituer les animaux à leur nouveau régime est évidente. Le Rat apprécie beaucoup les régimes riches en sucre lorsqu'ils sont présentés sous forme de bouillie : aussi tend-il, le premier jour, à en faire une consommation anormalement élevée qui l'oblige le lendemain à manger moins. En général, dès le 3^e jour, la quantité de nourriture ingérée redevient normale.

La nécessité d'éliminer des sujets dont le comportement risque de fausser les résultats du bilan est plus évidente encore. Mais, pour être en mesure de la réaliser, il faut évidemment constituer, au début de la période préparatoire, des lots d'animaux plus importants que ceux qui serviront à l'étude métabolique.

Pour tenir compte de tous ces faits, nous instituons toujours une période préparatoire de 3 jours, qui porte sur des lots comprenant un nombre de sujets plus élevé que celui qui doit être retenu finalement.

II. — DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Il existe de nombreux modèles de cages à métabolisme destinées à permettre, chez le Rat, la détermination des quantités de nourriture ingérées et la récolte séparée des fèces et de l'urine. La plupart de ces cages comportent une mangeoire extérieure et deux grilles métalliques, l'une à mailles larges sur laquelle est placé l'animal, l'autre à mailles serrées, située un peu plus bas, qui retient les crottes et laisse passer l'urine, celle-ci étant recueillie elle-même dans une fiole. Telle est, avec quelques variantes, le principe des cages utilisées par HENRIQUES et HANSEN [62], par LEVINE et SMITH [85], et par RAPP, SKINER et Mc HARGUE [119]. Un modèle un peu différent a été proposé par MITCHELL et CARMAN [102] : il s'agit d'une cage à une seule grille, qui laisse passer fèces et urine ; la cage est placée dans un cristallisateur dont le fond est garni d'une feuille de papier filtre, qui absorbe l'urine.

Ces divers modèles sont toujours utilisés à l'heure actuelle, à l'exception de celui de MITCHELL et CARMAN, qui semble à peu près abandonné. Malheureusement, tous présentent un double inconvénient : nécessité d'en-

lever l'animal et de démonter partiellement la cage pour recueillir les fèces, possibilité de contact prolongé entre les fèces et une partie de l'urine. Tout récemment, FONSECA [47] a proposé un perfectionnement qui élimine ces deux inconvénients : la grille à mailles serrées, qui arrête les fèces, est inclinée et, par un orifice de la cage, dirige immédiatement les crottes vers un récipient situé à l'extérieur. Mais la cage ainsi réalisée est de construction beaucoup plus complexe que les précédentes et de coût plus élevé.

FIG. 1

Nous préférons donc, à tous ces modèles, un dispositif de principe entièrement différent, et voisin de ceux qui ont été décrits par CHEVILLARD ⁽¹⁾ [26] FARRIS [42] et ABRAMSON [1].

⁽¹⁾ Nous remercions vivement M. CHEVILLARD, qui a bien voulu nous faire profiter de son expérience dans la réalisation des cages à métabolisme utilisées dans le présent travail.

Chaque cage (fig. 1) est formée d'un panier cylindrique en fil de fer étamé pour tubes à culture, dont le fil est supprimé sur une certaine surface et remplacé par une plaque de zinc percée de deux orifices circulaires de 30 mm de diamètre ; cette plaque est munie de deux glissières destinées à supporter deux mangeoires extérieures, — l'une pour la nourriture, l'autre pour l'eau de boisson —, qui viennent se placer face aux orifices de la plaque. Le fond de la cage est formé de fils parallèles assez espacés, sur lesquels il est à peu près impossible que les crottes soient retenues.

FIG. 2

La cage, fixée à un support en bois, est placée au-dessus d'un entonnoir en verre de 2 litres, de forme évasée (angle de 60°), dont la tige a été coupée à quelques centimètres du sommet. Cet entonnoir repose lui-même sur une

plaque de bois percée d'un orifice circulaire. Une poire en verre, dont le plus grand diamètre est supérieur de quelques millimètres au diamètre extérieur de la tige de l'entonnoir, est suspendue à cette dernière au moyen d'une attache métallique.

L'extrémité de la poire est légèrement engagée dans un flacon de verre placé lui-même dans un vase à précipitation de hauteur suffisante pour que les fèces ne puissent tomber en dehors.

Avec ce dispositif, la séparation des fèces et de l'urine est complète : l'urine coule le long de la poire et tombe dans le flacon, tandis que les crottes, butant contre la poire, tombent au fond du vase à précipitation. La hauteur de ce dernier rend les pertes impossibles.

Pour rincer, on enlève le flacon à urine et le vase qui contient les fèces et on les remplace par une fiole et un entonnoir (fig. 2).

III. — DURÉE D'UNE EXPÉRIENCE. VARIATIONS QUOTIDIENNES DE L'INGESTION ET DE L'EXCRÉTION CALCIFIQUES CHEZ LE RAT

La durée d'une étude métabolique doit être suffisante pour que les variations quotidiennes de l'appétit des animaux et celles des quantités de calcium excrétées n'influencent pas trop fortement sur les résultats obtenus.

D'autre part, il peut être nécessaire de prolonger l'expérience pendant une durée suffisamment longue pour que les résultats obtenus ne soient pas influencés par le mode d'alimentation avant l'expérience.

Nous n'aborderons ici que le premier point, nous réservant d'étudier l'autre dans la 3^e partie de ce travail.

EXPÉRIENCE. — Trois rats albinos de sexe mâle, nourris depuis le sevrage avec la provende n° 1 dont la composition a été indiquée antérieurement, et pesant tous 60 g, sont soumis au régime alimentaire ci-dessous :

Caséine	18
Huile d'arachide.....	9
Amidon de froment.....	44
Saccharose	24
Mélange salin de HUBBEL et coll., sans CO_3Ca	2
Carbonate de calcium	1
Agar-agar	2
Vitamines hydrosolubles et liposolubles.	

Le régime est présenté sous forme de bouillie cuite avec une partie d'eau distillée pour 2 parties de mélange sec.

Nous avons déterminé quotidiennement ⁽¹⁾ durant 15 jours, le calcium ingéré, le calcium fécal et le calcium urinaire, et à partir de ces valeurs, nous avons évalué par calcul, pour chaque jour d'expérience :

— l'excrétion calcique totale, et les proportions du calcium excrété qui sont éliminées respectivement par voie intestinale et par voie rénale ;

(1) Sauf dans quelques cas, où les déterminations ont porté sur 2 jours consécutifs.

- la rétention calcique ;
- le bilan $\left(\frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca ingéré}} \times 100 \right)$.

Tous ces calculs ont été effectués en faisant correspondre aux ingesta de chaque jour les excréta du lendemain (voir plus loin).

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau IV. On voit que, d'un jour à l'autre, les quantités de calcium ingérées, excrétées et retenues varient considérablement. Les variations de l'ingestion calcique, dûes à celles de l'appétit, sont les moins marquées. Les variations de l'excrétion urinaire et de l'excrétion fécale sont beaucoup plus importantes et retiennent évidemment sur la rétention du calcium, ainsi que sur la valeur du bilan. Il est intéressant de remarquer que de telles irrégularités ne sont pas particulières au Rat : LEROY, FRANÇOIS et CHARLET [84 bis], nous ont signalé qu'ils les avaient également observées chez le Porc.

TABLEAU IV

(1^{ère} partie)

Variations quotidiennes de l'ingestion, de l'excrétion et de la rétention du calcium chez le rat.

Jours	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	Bilan
	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100
<i>Rat n° 1 :</i>						
1 ^{er} et 2 ^e (*)..	32,5	16,55	0,14	16,69	15,8	48,6
3 ^e	33,4	26,95	0,81	27,76	5,7	17,0
4 ^e	49,8	20,87	0,26	21,13	28,7	57,6
5 ^e et 6 ^e (*)..	40,1	26,09	0,56	26,65	13,5	33,7
7 ^e	41,5	19,48	0,24	19,72	21,8	52,5
8 ^e	39,6	27,23	0,21	27,44	12,2	30,8
9 ^e	47,4	25,32	0,11	25,43	22,0	46,4
10 ^e	33,3	13,52	0,21	13,73	19,6	58,8
11 ^e	45,3	18,89	0,32	19,21	26,1	57,6
12 ^e et 13 ^e (*)..	45,3	27,23	0,10	27,33	18,0	39,7
14 ^e	42,6	38,85	0,29	39,14	3,5	8,2
15 ^e	56,1	13,72	0,32	14,04	42,1	75,0
<i>Rat n° 2 :</i>						
1 ^{er} et 2 ^e (*)..	59,6	25,04	1,00	26,04	33,6	56,4
3 ^e	57,0	30,71	1,46	32,17	24,8	43,5
4 ^e	64,5	28,53	0,84	29,37	35,1	54,4
5 ^e et 6 ^e (*)..	52,5	23,52	1,22	24,74	27,8	52,9
7 ^e	57,9	23,06	0,91	23,97	33,9	58,5
8 ^e	67,2	32,88	0,71	33,59	33,6	50,0
9 ^e	72,0	39,36	0,69	40,05	32,0	44,4
10 ^e	77,4	22,18	0,65	22,83	54,6	70,5
11 ^e	66,3	45,52	0,75	46,27	20,0	30,2
12 ^e et 13 ^e (*)..	67,2	31,32	0,49	31,81	35,4	52,7
14 ^e	58,8	22,94	0,59	23,53	35,3	60,0
15 ^e	84,9	40,95	0,87	41,82	43,1	50,8

(*) Moyennes des deux jours consécutifs.

TABLEAU IV

(2^e partie)

Variations quotidiennes de l'ingestion, de l'excrétion et de la rétention du calcium chez le rat.

Jours	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	Bilan
	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100
<i>Rat n° 14</i>						
1 ^{er} et 2 ^e (*)	67,2	29,17	0,66	29,83	37,4	55,6
3 ^e	63,0	26,58	1,40	27,98	35,0	55,6
4 ^e	50,4	28,75	0,33	29,08	21,3	42,3
5 ^e et 6 ^e (*)	63,5	36,28	0,52	36,80	26,7	42,0
7 ^e	59,5	14,99	0,58	15,57	43,9	73,8
8 ^e	75,0	31,61	0,70	32,31	42,7	56,9
9 ^e	81,6	35,19	0,65	35,84	45,8	56,1
10 ^e	73,8	18,12	0,78	18,90	54,9	74,4
11 ^e	75,0	25,64	0,50	26,14	48,9	65,1
12 ^e et 13 ^e (*)	68,1	27,79	0,64	28,43	39,7	58,2
14 ^e	64,6	34,99	0,35	35,34	29,3	45,3
15 ^e	93,3	52,58	0,66	53,24	40,1	42,9

(*) Moyennes des deux jours consécutifs.

Nous avons calculé d'autre part les mêmes séries de valeurs (Ca ingéré, Ca fécal, Ca urinaire, Ca retenu, etc.) pour différentes durées du bilan : après 2, 3, 4, ... 15 jours. Ces calculs nous ont permis de tracer les

FIG. 3. — Valeurs du bilan calcique en fonction de la durée de l'expérience (régime à 0,47 p. 100 de calcium).

courbes de la figure 3, qui montrent que, vers la fin de l'expérience, les résultats obtenus ne varient plus sensiblement d'un jour à l'autre.

Nous avons fixé la durée des études métaboliques à 10 jours pour les

recherches exposées dans la seconde partie de ce travail et à 7 jours seulement pour celles qui font l'objet de sa troisième partie. Une durée de 7 à 10 jours semble suffisante, — au moins lorsque le régime renferme une quantité moyenne de calcium — pour éviter les variations de grande amplitude qui peuvent se produire dans les premiers jours du bilan ; l'importance de ces variations est plus réduite si l'on utilise des lots formés de plusieurs sujets.

IV. — DÉTERMINATION DES INGESTA

Pour déterminer les quantités de calcium ingérées par les animaux, il suffit :

- de doser le calcium dans les régimes ;
- de peser aussi exactement que possible les mangeoires, d'abord au moment où on vient de les remplir, puis 24 heures plus tard lorsqu'on les remplace par d'autres : on en déduit ainsi la quantité de régime consommée et, par analyse de ce régime, la quantité de calcium ingérée.

La pesée des mangeoires ne peut guère se faire sur un trébuchet lorsqu'on travaille simultanément, comme nous l'avons fait, sur un grand nombre d'animaux. On peut se contenter d'une balance automatique graduée en demi-grammes, sensible, fidèle et parfaitement réglée, qui permet d'effectuer les deux pesées successives de chaque mangeoire avec une erreur qui ne dépasse guère 1/10 de g. Cette erreur n'est pas négligeable ; elle reste cependant trop faible pour affecter vraiment la signification des résultats obtenus.

On pourrait faire une autre objection à notre méthode : c'est que, d'un jour à l'autre, à la température de la salle d'expérience (20°), une partie de l'eau des régimes peut s'évaporer, la seconde pesée ne portant donc pas exactement sur le même produit que la première. Nous avons donc abandonné pendant deux jours dans la salle d'expériences des mangeoires qui contenaient un poids connu de régime cuit ; ces mangeoires étaient fixées dans la position habituelle à des cages vides. Après ces deux jours, nous avons toujours retrouvé le poids primitif à 2/10 de g près.

V. — RÉCOLTE, CONSERVATION ET HOMOGENÉISATION DES EXCRETA

Chez le Rat, les seules voies d'excrétion du calcium sont la voie intestinale et la voie urinaire : contrairement à ce qui se produit chez l'Homme, il n'y a pas d'élimination cutanée du calcium, puisque le Rat ne possède pas de glandes sudoripares.

Au cours d'une expérience qui dure de 7 à 10 jours, et qui porte sur un grand nombre de sujets, il est impossible et d'ailleurs inutile de recueillir

quotidiennement les excréta. Il suffit d'en faire la récolte à la fin de l'expérience, en veillant seulement à ce que les fèces ne demeurent pas sur les parois du dispositif expérimental et que le flacon d'urine ne déborde jamais.

Le moment où il convient de commencer la récolte des excréta ne saurait être fixé avec précision, car la vitesse du transit des aliments et des produits de leur digestion dans le tube digestif du Rat est assez mal connue. Pour en évaluer l'ordre de grandeur, nous avons distribué, à plusieurs jeunes rats de 70 g jeûnant depuis une demi-journée, un régime alimentaire équilibré comparable à ceux qui ont servi pour nos recherches, et coloré au carmin. A partir de la 12^e heure, les fèces ont été recueillies toutes les heures : les premières crottes colorées au carmin ont été émises une vingtaine d'heures après le début de la prise des aliments. Nous avons donc décidé de commencer à recueillir les fèces 1 jour après le début de la détermination des ingesta. D'autre part, pour faciliter la conduite des expériences et les calculs ultérieurs, nous avons toujours commencé à recueillir l'urine au même moment. L'erreur qui peut en résulter est minime, puisque, dans des conditions normales d'alimentation, l'élimination urinaire du calcium représente au plus 1 ou 2 p. 100 de la perte calcique totale.

A la fin de l'expérience, l'urine est récoltée intégralement et reversée dans un flacon plus grand, ou mieux dans une fiole jaugée de capacité convenable (250 cm³ pour un bilan de 7 à 10 jours). Au moyen d'une pissette à extrémité très effilée, on rince soigneusement, à l'eau distillée chaude, la cage qui contenait l'animal, ainsi que l'entonnoir, la poire en verre et le flacon ; les eaux de rinçage sont jointes à l'urine et le tout est ajusté à un volume convenable, aussi peu élevé que possible.

Le liquide peut être conservé pendant longtemps dans un réfrigérateur à 5°. L'addition de quelques cristaux de cyanure de mercure est parfois utilisée pour en empêcher l'altération. Mais on ne peut plus alors terminer le dosage du calcium urinaire par manganimétrie : en effet, au moment de la précipitation du calcium, le sel mercurique est réduit avec formation de mercure métallique qui grisaille le précipité, et la titration au permanganate risque de donner des résultats erronés par excès. Nous nous abstenons donc de recourir à ce procédé.

Quant aux fèces, leur récolte peut être rendue délicate par la présence de poils au fond des vases à précipitation. D'une manière générale, les rats jeunes perdent très peu de poils : au contraire, quand ils approchent de l'état adulte, il arrive qu'en une semaine, la perte soit suffisante pour obliger à trier les crottes une à une avec une pince.

D'après les quelques dosages que nous avons effectués, les poils de Rat contiennent de 0,4 à 0,5 p. 100 de calcium. Cependant, ce n'est pas pour cette raison que leur présence dans les fèces est gênante, le poids de

poils perdus n'atteignant jamais de valeurs très élevées. Mais ils peuvent rendre difficile la mouture fine des fèces.

Les fèces recueillies et triées sont placées dans des boîtes à tare, puis elles séjournent dans une étuve à 100° jusqu'à ce qu'elles aient atteint un poids constant. On les réduit alors en poudre très fine au moyen d'un moulin turc et on les conserve dans des flacons hermétiquement clos.

VI. — TECHNIQUES CHIMIQUES

Une étude du métabolisme calcique par la méthode des bilans exige surtout de nombreux dosages de calcium dans les ingesta et dans les excreta, mais aussi des déterminations de poids secs et des dosages de phosphore dans les régimes en vue de connaître la valeur de leur rapport Ca/P.

D'autres techniques de dosages chimiques et biologiques ont été employées dans notre travail, notamment pour l'analyse complète des régimes d'élevage et pour certaines recherches sur la vitamine D : ces techniques ont été indiquées ou le seront plus loin. Nous nous limiterons ici aux seules techniques indispensables pour réaliser un bilan calcique.

1° Poids secs

Nous n'avons effectué des déterminations de poids secs que sur les régimes des animaux, en vue de vérifier l'identité de leur taux d'hydratation.

Les déterminations sont faites sur des prises d'essai de l'ordre de 2 g, prélevées en divers points des régimes, puis abandonnées dans des boîtes à tare à l'étude à 100° jusqu'à poids constant.

Nous avons ainsi obtenu, pour des régimes préparés avec deux parties de mélange sec et une partie d'eau distillée, des poids secs de l'ordre de 60 p. 100 ($\pm$ 0,5 p. 100), alors qu'ils auraient dû atteindre 66,6 p. 100 si le taux d'hydratation des constituants du régime avait été nul ou très faible.

2° Dosage du calcium

a) Prises d'essai et minéralisation.

La minéralisation des *régimes* porte sur des prises d'essai de l'ordre de 2 grammes, prélevées en divers points. Ces prises sont placées dans des filtres sans cendres de 55 mm de diamètre et de poids standard,

roulés en forme de cornets ⁽¹⁾, puis introduites dans des matras de Kjeldahl de 150 cm³.

Nous employons la technique de minéralisation nitroperchlorique, suivie de deux reprises successives du résidu par 5 cm³ d'acide chlorhydrique. Ce résidu est ensuite dissous à chaud dans quelques cm³ d'eau distillée additionnée de 5 à 10 gouttes d'acide chlorhydrique.

Dans le cas des *fèces*, la minéralisation porte sur des prises de l'ordre de 300 mg. Les pesées sont faites dans de petites capsules de porcelaine qui, après transvasement des fèces dans des matras de 150 cm³, sont rincées soigneusement à l'eau distillée au moyen d'une pissette à jet très fin. La minéralisation est menée de la même manière que pour les régimes.

La minéralisation des *urines* porte sur des prises d'essai de 10 à 50 cm³, suivant la teneur en calcium présumée des échantillons analysés. Ces prises sont effectuées après agitation du liquide, qui contient toujours un sédiment plus ou moins important.

Nous avons substitué, à la minéralisation nitroperchlorique, une simple minéralisation nitrique. En effet, dans les urines, les matières organiques sont en faible quantité et la minéralisation nitrique suffit à les détruire. D'autre part, la minéralisation nitroperchlorique donne lieu à la formation d'un important insoluble chlorhydrique ; en outre, dans le liquide limpide obtenu par filtration à chaud, un nouveau résidu peut se former au cours du refroidissement. Le dosage du calcium dans les « doubles » d'une même urine donne alors des résultats très divergents : les différences obtenues peuvent atteindre 10 à 20 p. 100, parfois plus encore.

Si les résultats obtenus par minéralisation nitrique sont plus satisfaisants qu'après minéralisation nitroperchlorique, les écarts entre les doubles d'une même urine n'en sont pas moins plus élevés que dans le cas des régimes ou des fèces. Nous croyons pouvoir attribuer ce fait à la difficulté que présente l'obtention de prises d'essai vraiment représentatives des urines totales.

b) Dosage.

Nous dosons le calcium par une méthode très voisine de celles que GUILLAUMIN [59, 60] préconise pour le sang.

Le calcium est précipité sous forme d'oxalate à pH 4,6 en présence de rouge de méthyle : dans ces conditions, la précipitation est sélective [23]. Le précipité est dissous dans l'acide sulfurique à 20 p. 100, et on termine le dosage par manganimétrie. Du résultat obtenu, il faut déduire

⁽¹⁾ Les « blancs » correspondant à ces dosages doivent donc porter sur des filtres semblables, en même temps que sur les réactifs.

la quantité de solution permanganique nécessaire pour obtenir avec les réactifs du dosage (et le papier filtre dans le cas des régimes) une coloration terminale de la même intensité.

3° Dosage du phosphore

Le phosphore n'a été dosé que dans les régimes alimentaires pour permettre la détermination de leur rapport Ca/P.

Nous avons utilisé la méthode de THIVOLLE [148, 149] qui est basée sur la précipitation du phosphore sous forme de phosphomolybdate d'ammonium et sur la réduction de ce dernier par l'hydrogène naissant avec formation de sesquioxyde de molybdène. On termine le dosage en titrant le sesquioxyde par molybdomanganimétrie en utilisant l'acétate de benzidine comme indicateur.

La méthode est appliquée sans modification. Cependant, nous substituons à la minéralisation cupro-nitrique que THIVOLLE préconise pour sa rapidité d'exécution, la minéralisation nitro-perchlorique.

VII. — MODES D'EXPRESSION DES RÉSULTATS

A partir des données immédiates d'une étude métabolique (quantités de calcium ingérées et excrétées par voie fécale et par voie urinaire), on peut calculer la *réten-tion calcique*.

$$\text{Ca} = \text{retenu Ca ingéré} - (\text{Ca fécal} + \text{Ca urinaire}).$$

On peut également déterminer la proportion dans laquelle le calcium ingéré est utilisé par l'organisme. Pour cela, on calcule généralement le *coefficient de réten-tion* du calcium :

$$\text{C.R.} = \frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca ingéré}} \times 100 = \frac{\text{Ca ingéré} - (\text{Ca fécal} + \text{Ca urinaire})}{\text{Ca ingéré}} \times 100$$

Cette terminologie est la plus couramment employée. Toutefois, elle n'a pas l'adhésion de tous les expérimentateurs. Certains appellent le rapport précédent : *coefficient d'utilisation* du calcium. Mais les chercheurs de l'école de MITCHELL, emploient cette expression pour désigner un rapport tout différent, qui sera défini plus loin. Ajoutons que JACQUOT et collab. [70, 71] substituent à l'expression « coefficient de réten-tion » le mot « bilan » et que, par analogie avec la terminologie adoptée dans l'étude expérimentale du métabolisme azoté, ils réservent le terme « coefficient de réten-tion » pour désigner le rapport :

$$\frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca absorbé apparent}} \times 100 = \frac{\text{Ca ingéré} - (\text{Ca fécal} + \text{Ca urinaire})}{\text{Ca ingéré} - \text{Ca fécal}} \times 100$$

Mais JACQUOT souligne l'absence de signification physiologique précise de ce rapport, en raison de la présence dans les fèces, avec le calcium

alimentaire non absorbé, de quantités appréciables de calcium endogène : calcium des sécrétions digestives ⁽¹⁾ et vraisemblablement calcium excrété par la muqueuse intestinale. Bien que le rôle de cette dernière dans l'excrétion du calcium, demeure controversé, il semble en effet qu'on puisse en admettre aujourd'hui la réalité ⁽²⁾.

Il apparaît donc préférable de renoncer au calcul du rapport précédent, et même d'ailleurs qu'à celui du coefficient d'absorption apparent, qui se définit par la formule :

$$\frac{\text{Ca absorbé apparent}}{\text{Ca ingéré}} \times 100 \quad \frac{\text{Ca ingéré} - \text{Ca fécal}}{\text{Ca ingéré}} \times 100$$

Pour comparer l'importance respective des éliminations fécale et urinaire de calcium, nous croyons préférable de calculer simplement les deux rapports suivants :

$$\frac{\text{Ca fécal}}{\text{Ca excrété total}} \times 100 \quad \frac{\text{Ca urinaire}}{\text{Ca excrété total}} \times 100$$

⁽¹⁾ Le suc gastrique (SCHMIDT et GREENBERG [123]), le suc pancréatique (AGREN (3) et la bile (GILBERT [53]) déversent des quantités de calcium appréciables dans le tractus gastro-intestinal. Mais ce calcium peut être ensuite partiellement réabsorbé.

⁽²⁾ Sans aller jusqu'à nier le rôle de la muqueuse intestinale dans l'excrétion du calcium, certains expérimentateurs mettent en doute son importance. Ainsi, NICOLAYSEN [107a] constate, chez le Chien, que la perte fécale de calcium n'est affectée ni par l'administration parentérale de sels calciques, ni par la mobilisation des réserves de calcium de l'organisme sous l'influence de la parathormone. Étudiant chez le Rat l'utilisation physiologique du calcium du lait, HENRY et KON [63] ne rencontrent aucun fait qui puisse justifier l'existence d'une excrétion active de calcium à travers les muqueuses du tractus gastro-intestinal. Chez le Rat également, ADOLPH et LIANG [2] constatent que la perte fécale de calcium n'est pas en rapport avec le « niveau » du métabolisme calcique : en effet, après injection intraveineuse de sels calciques, cette perte est la même pour des animaux soumis respectivement à un régime riche et à un régime pauvre en calcium. De même, Mc CANCE et WIDDOWSON [90] ne retrouvent pas, dans les fèces, le calcium injecté par voie intraveineuse à des hommes adultes en bon état de santé.

Cependant, de nombreux auteurs ont pu mettre en évidence le rôle joué par la muqueuse intestinale dans l'excrétion du calcium et précisent même à quels niveaux du tube digestif l'excrétion est la plus active. Pour ARISTOWSKI [5], l'absorption calcique se localise au niveau du duodénum et du jejunum, l'excrétion se produisant dans le gros intestin ; c'est également l'avis de BERGEIM [10]. Mais CRUTO [32], qui utilise pourtant les mêmes techniques que BERGEIM (étude de l'absorption intestinale par adjonction aux aliments d'une matière inerte : l'oxyde de fer) et qui travaille comme lui sur le Rat, parvient à des conclusions différentes : l'excrétion calcique serait plus importante, que l'absorption au niveau du duodénum ; les faits s'inversent dans le cœcum, et l'excrétion prédomine de nouveau dans le colon. Le rôle du colon dans l'élimination du calcium est également reconnu chez le Chat par TAYLOR et FINE [147], chez le Porc par MAREK et collab. [97], chez le Lapin par COWELL [31] : toutefois, à l'exception de COWELL, ces expérimentateurs concluent qu'il s'agit d'une excrétion peu importante et indépendante des conditions expérimentales. Sans se préoccuper de localiser l'excrétion, STEGGERDA et MITCHELL [145] apportent un autre argument en faveur d'une excrétion de calcium à travers l'intestin : ils font observer que, dans les fèces de sujets humains soumis à un régime pauvre en calcium, on peut retrouver cet élément en quantité deux ou trois fois supérieure à celle qui est consommée. Signalons enfin les recherches de FOURNIER [49], qui a suivi l'absorption intestinale du calcium chez le Rat au moyen d'une matière inerte ajoutée aux aliments (l'oxyde de titane) : pour cet auteur, l'élimination calcique prédomine généralement sur l'absorption dans la première moitié de l'intestin grêle et elle est toujours plus importante que cette dernière dans le gros intestin.

Ces conclusions positives, — nous parlons du fait général d'une excrétion active de calcium à travers les muqueuses de l'intestin, et non de sa localisation —, sont confirmées par quelques recherches faites au moyen de calcium marqué, dont l'emploi est ici d'un intérêt évident. PECHIER [111] retrouve dans le tube digestif de la Souris une forte proportion du calcium radioactif administré par voie parentérale. GREENBERG [56], WALLACE et collab. [157], L'HEUREUX et collab. [86], arrivent à des conclusions identiques chez le Rat. Les résultats obtenus par WALLACE et collab. sont les plus complets : ces auteurs injectent par voie intramusculaire 17 microcuries de Ca^{45} sous forme de chlorure de calcium à des rats jeunes ou adultes et constatent que tous les segments de l'intestin grêle participent à l'excrétion du calcium, le rôle du gros intestin étant beaucoup moins important ; après 336 heures, ils retrouvent, dans les fèces, respectivement 15,2 p. 100 et 41,6 p. 100 de la dose injectée. L'excrétion active du calcium au niveau du gros intestin est également considérée comme très faible ou même nulle par L'HEUREUX et collab.

En dépit des divergences signalées, il semble donc qu'on puisse conclure à la présence, dans les fèces, de quantités appréciables de calcium endogène.

Pour notre part, nous employerons l'expression *coefficient de rétention* dans son sens le plus habituel (pourcentage du calcium ingéré qui est retenu dans l'organisme pour un niveau d'ingestion déterminé) en prenant le terme de *bilan* comme synonyme.

Lorsque nous utiliserons le terme *coefficient d'utilisation*, ce sera dans le même sens que l'école de MITCHELL.

Cette notation repose sur les considérations suivantes : MITCHELL et McCCLURE [104] ont fait remarquer que le calcul du coefficient de rétention du calcium chez les sujets en croissance ne tient pas compte d'un éventuel besoin d'entretien et peut ainsi conduire à sous-estimer l'utilisation physiologique réelle du calcium alimentaire. Pour tenir compte de ce fait, MITCHELL et collab. [76] ont proposé de soumettre successivement les sujets étudiés à deux régimes R_1 et R_2 de taux calciques nettement différents, le régime le plus riche en calcium (R_1) n'assurant cependant qu'une rétention calcique inférieure au maximum. L'utilisation du calcium alimentaire est calculée par la formule suivante :

$$\frac{[\text{Ca ingéré } (R_1) - \text{Ca ingéré } (R_2)] - [\text{Ca excrété } (R_1) - \text{Ca excrété } (R_2)]}{\text{Ca ingéré } (R_1) - \text{Ca ingéré } (R_2)} \times 100$$

Les recherches exposées dans la deuxième partie du présent travail nous amèneront à discuter l'intérêt de ce coefficient. Mais dès maintenant, nous pouvons préciser qu'en dépit des arguments de MITCHELL et collab., nous continuons à lui préférer le classique coefficient de rétention.

DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE DE LA TENEUR EN CALCIUM DU RÉGIME ALIMENTAIRE SUR L'ASSIMILATION DU CALCIUM CHEZ LE JEUNE RAT

Chapitre IV

INFLUENCE DE LA TENEUR EN CALCIUM DU RÉGIME ALIMENTAIRE SUR L'ASSIMILATION DU CALCIUM EN L'ABSENCE DE VITAMINE D

A. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Le problème abordé dans le présent chapitre semble n'avoir jamais fait l'objet d'études systématiques. La plupart des travaux consacrés à l'influence de la teneur en calcium du régime alimentaire sur l'utilisa-

tion physiologique de cet élément, chez les animaux ou chez l'Homme, ont porté sur des sujets qui recevaient de la vitamine D : c'est dans le chapitre suivant que nous en exposerons les résultats essentiels.

Dans ce domaine, nous ne connaissons qu'une seule étude effectuée en l'absence de vitamine D. Elle est due à FROMHERZ et SUTTER [52], qui ont déterminé la rétention calcique de plusieurs groupes de jeunes rats pour deux niveaux d'ingestion très différents. Certains sujets étaient soumis à un régime de base renfermant 0,154 p. 100 de calcium (avec un rapport Ca/P de 0,92) ; d'autres sujets recevaient le même régime, additionné de quantités de phosphate bicalcique ou de gluconate de calcium qui en portaient le taux calcique à 0,527 p. 100 (avec un rapport Ca/P de 1,19 dans le premier cas et de 3,12 dans le second).

Dans les deux cas, l'enrichissement du régime en calcium s'est traduit par une forte augmentation de la quantité de calcium retenue et par une légère diminution du coefficient de rétention du calcium.

B. — RECHERCHES PERSONNELLES

I. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Nos recherches ont porté sur 36 jeunes rats blancs, du sexe mâle, qui provenaient de mères nourries avec la provende n° 1 (voir le tableau I) ; ils étaient âgés de 40 à 50 jours et pesaient tous entre 60 et 80 g au début de l'expérience. Ces animaux ont été répartis en 9 lots homogènes de 4 sujets, suivant les indications données dans la première partie.

La composition des 9 régimes utilisés est indiquée dans le *tableau V*. On voit que ces régimes sont pratiquement identiques, sauf en ce qui concerne leur teneur en calcium. Dans le cas des régimes III à IX, cette teneur en calcium a été assurée en complétant le mélange salin avec des quantités convenables de carbonate de calcium, qui se substituent à d'égales quantités d'amidon. Le carbonate a été choisi parce que c'est l'un des sels calciques les plus couramment employés dans la préparation des régimes expérimentaux, et parce qu'il est bien utilisé par l'organisme du Rat (STEENBOCK et collab. [144], TYLER et WILLCOX [153], JACQUOT et collab. [70], ESCUDERO et HERRAIZ [37], etc...).

Le taux calcique alimentaire rapporté à 100 g d'aliments secs varie, du régime I au régime IX, entre des limites extrêmement éloignées. Les lots sont spécialement nombreux pour les taux calciques alimentaires inférieurs à 0,5 p. 100, ce qui permet de tracer des courbes d'excrétion et de rétention précises dans cette zone, qui nous paraît spécialement importante pour l'étude des besoins calciques du jeune Rat.

Nous n'avons pas cherché à maintenir constant le rapport Ca/P des différents régimes. Pour cela, il aurait fallu ajouter à la plupart d'entre

eux une quantité de phosphates importante. Une telle addition eut présenté un double inconvénient. D'une part, elle risquait de charger exagérément les derniers régimes en certains cations, ceux-ci pouvant influencer à leur tour sur l'assimilation du calcium : on sait par exemple que certains sels potassiques accroissent l'élimination urinaire du calcium chez le Rat (JACQUOT et collab. [71]), et que l'effet du magnésium sur le métabolisme calcique dépend de la teneur en calcium du régime alimentaire (ROGOZINSKI et GLOWCZINSKI [120] ; L. RANDOIN et CAUSERET [112, 113]). D'autre part, si nous avions maintenu constant le rapport Ca/P, nous n'aurions pas pu déterminer l'influence propre du taux calcique alimentaire sur l'utilisation physiologique du calcium.

Il nous a donc semblé préférable de ne pas modifier la teneur en phosphore des divers régimes : cette teneur atteint 0,250 p. 100 et est assurée principalement par la présence de 40 p. 100 de phosphate monopotassique dans le mélange salin utilisé.

TABLEAU V
Composition des régimes alimentaires.

Constituants des régimes	Régimes alimentaires								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g	p. 100 g
Caséine ordinaireg	0	18	18	18	18	18	18	18	18
Caséine lavée à l'alcool g	18	0	0	0	0	0	0	0	0
Huile d'arachideg	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Amidong	45	45	44,87	44,75	44,50	44	43,25	42,50	40
Saccharoseg	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Mélange salin spécial ⁽¹⁾ g	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Carbonate de calcium g	0	0	0,125	0,25	0,50	1	1,75	2,50	5
Agar-agarg	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Vitamines ⁽²⁾g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Calcium introduit à l'état de carbonatemg	0	0	50	100	200	400	700	1000	2000
Calcium totalmg	37,1	66,4	116,4	166,4	266,4	466,4	766,4	1066,4	2066,4
Rapport Ca/P	0,15	0,27	0,47	0,67	1,07	1,87	3,07	4,27	8,27

⁽¹⁾ Mélange salin de HUBBEL et coll., privé de carbonate de calcium. Voir la composition de ce mélange p. 284.

⁽²⁾ Voir p. 285 la composition des mélanges vitaminiques.

Les 9 régimes ont été préparés comme il a été indiqué antérieurement et présentés aux animaux sous forme de bouillies homogènes et liquides obtenues par cuisson rapide de 2 parties de mélange sec avec 1 partie d'eau distillée.

Le dispositif expérimental utilisé pour la détermination des ingesta et pour la récolte des excréta a été également décrit dans la première partie de ce travail : nous n'y reviendrons donc pas ici. Nous nous contenterons de signaler que, sauf pendant la durée, extrêmement brève, des

soins quotidiens, les animaux sont demeurés à l'obscurité pendant toute la période expérimentale : la biosynthèse de la vitamine D sous l'influence des radiations ultraviolettes d'origine solaire a été ainsi rendue impossible. D'autre part, la température de la salle d'animaux est demeurée constante (20°).

L'expérience a duré 10 jours, la récolte des fèces et celle de l'urine commençant 24 heures après celle des ingesta.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Le comportement des 36 animaux a été normal pendant toute la durée de l'expérience. Le seul fait caractéristique d'une insuffisance calcique a été, chez les animaux des lots I à V inclus, une nette diminution de l'appétit (voir la figure 4).

FIG. 4. — Consommation moyenne de nourriture des divers lots en g. par jour.

Lot I : 7,44	Lot IV : 8,99	Lot VII : 12,41
Lot II : 7,22	Lot V : 10,30	Lot VIII : 12,62
Lot III : 8,16	Lot VI : 11,77	Lot IX : 13,06

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VI. Les valeurs indiquées dans la dernière colonne de ce tableau ont été calculées par la formule habituelle :

$$\text{Bilan} = \frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca ingéré}} \times 100 = \frac{\text{Ca ingéré} - (\text{Ca fécal} + \text{Ca urinaire})}{\text{Ca ingéré}} \times 100$$

TABLEAU VI (1^{ère} partie).

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en l'absence de vitamine D.*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	Ca fécal $\times 100$ Ca excr.	Ca urin. $\times 100$ Ca excr.	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	100	p. 100	p. 100
<i>Rég. I (0,037 % Ca) :</i>									
Rat 1	+ 16	26,60	6,32	1,54	7,86	18,74	80,4	19,59	70,4
Rat 2	— 4	23,28	7,49	1,80	9,29	13,99	80,6	19,37	60,1
Rat 3	+ 11	32,42	9,07	2,61	11,68	20,72	77,6	22,35	63,9
Rat 4	+ 7	28,10	12,86	1,82	14,68	13,42	87,6	12,40	47,8
Moyennes		27,60	8,93	1,94	10,87	16,73	82,2	17,8	60,5
<i>Rég. II (0,066 % Ca) :</i>									
Rat 5	+ 10	35,20	6,16	1,20	7,36	27,84	83,7	16,30	79,1
Rat 6	+ 22	52,43	8,82	1,21	10,03	40,40	87,9	12,06	80,9
Rat 7	+ 20	55,81	9,13	1,29	10,42	45,39	87,6	12,38	81,3
Rat 8	+ 11	48,43	16,10	2,37	18,47	29,96	87,2	12,83	61,9
Moyennes		47,97	10,05	1,52	11,57	36,40	86,9	13,1	75,8
<i>Rég. III (0,116 % Ca) :</i>									
Rat 9	+ 18	75,02	8,22	1,61	9,83	65,19	83,6	16,38	86,9
Rat 10	+ 24	94,63	20,50	1,90	22,40	72,23	91,5	8,48	76,3
Rat 11	+ 28	106,18	17,47	1,34	18,81	87,37	92,9	7,12	82,3
Rat 12	+ 31	102,90	20,20	1,30	21,50	81,40	93,9	6,05	79,1
Moyennes		94,68	16,60	1,54	18,13	76,54	90,5	9,5	80,8

TABLEAU VI (2^e partie).

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en l'absence de vitamine D.*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	Ca fécal $\times 100$ Ca excr.	Ca urin. $\times 100$ Ca excr.	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	p. 100	p. 100
<i>Rég. IV (0,166 % Ca) :</i>									
Rat 13	+ 25	130,5	33,1	1,41	34,6	95,9	95,9	4,07	73,5
Rat 14	+ 30	150,8	38,5	2,07	40,6	110,2	94,9	5,10	73,1
Rat 15	+ 27	146,1	37,8	2,31	40,1	106,0	94,2	5,76	72,5
Rat 16	+ 29	170,9	34,6	1,57	36,2	134,7	95,7	4,33	78,8
Moyennes		149,6	36,0	1,84	37,9	111,7	95,2	4,8	74,5
<i>Rég. V (0,266 % Ca) :</i>									
Rat 17	+ 32	249,4	88,6	1,89	90,5	158,9	97,9	2,09	63,7
Rat 18	+ 36	266,3	101,3	1,46	102,8	163,5	98,6	1,42	61,4
Rat 19	+ 48	298,4	93,9	2,76	96,7	201,7	97,1	2,85	67,6
Rat 20	+ 35	283,0	143,7	1,74	145,4	137,6	98,8	1,20	48,6
Moyennes		274,3	106,8	1,96	108,8	165,4	98,1	1,9	60,3
<i>Rég. VI (0,466 % Ca) :</i>									
Rat 21	+ 58	615,6	269,1	5,16	274,3	341,3	98,1	1,88	55,4
Rat 22	+ 37	488,6	219,5	3,68	223,2	265,4	98,3	1,65	54,3
Rat 23	+ 40	500,5	235,0	4,45	239,4	261,1	98,1	1,86	52,2
Rat 24	+ 46	591,1	289,8	2,48	292,3	298,8	99,1	0,85	50,5
Moyennes		548,9	253,4	3,94	257,3	291,6	98,4	1,5	53,1

TABLEAU VI (3^e partie).

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en l'absence de vitamine D.*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	$\frac{\text{Ca fécal}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	$\frac{\text{Ca urin.}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	p. 100	p. 100
<i>Rég. VII (0,766 % Ca) :</i>									
Rat 25	+ 44	973,2	695,0	7,89	702,9	270,3	98,9	1,12	27,8
Rat 26	+ 33	940,7	634,4	2,59	637,0	303,7	99,6	0,41	32,3
Rat 27	+ 35	934,3	637,5	3,41	640,9	293,4	99,5	0,53	31,4
Rat 28	+ 44	957,4	526,0	2,40	528,4	420,0	99,5	0,45	44,8
Moyennes		951,4	623,2	4,07	627,7	324,1	99,4	0,6	34,1
<i>Rég. VIII (1,066 % Ca) :</i>									
Rat 29	+ 54	1484,4	975,0	22,50	997,5	486,9	97,7	2,26	34,3
Rat 30	+ 26	1034,5	692,4	2,45	694,8	339,7	99,6	0,35	33,0
Rat 31	+ 44	1401,6	1021,3	6,25	1027,5	374,1	99,4	0,61	27,1
Rat 32	+ 41	1462,2	1045,1	6,80	1051,9	410,3	99,3	0,65	28,5
Moyennes		1345,7	933,4	9,50	942,9	402,7	99,0	1,0	30,7
<i>Rég. IX (2,066 % Ca) :</i>									
Rat 33	+ 36	2452,2	1867,0	12,64	1879,6	572,6	99,3	0,67	23,3
Rat 34	+ 36	2788,3	1949,2	20,91	1970,1	818,2	98,9	1,06	29,3
Rat 35	+ 31	2757,0	1682,1	15,01	1697,1	1059,9	99,1	0,88	38,4
Rat 36	+ 46	2794,1	2114,9	14,68	2129,6	664,5	99,3	0,69	23,8
Moyennes		2697,9	1903,3	15,81	1919,1	778,8	99,2	0,8	28,7

III. — DISCUSSION

1^o Ingestion calcique

La courbe d'ingestion calcique en fonction du taux calcique alimentaire se compose de deux parties : l'une qui correspond aux régimes I à VI, l'autre aux régimes VI à IX.

Il nous a semblé intéressant de déterminer approximativement la forme et l'équation des deux parties de cette courbe, ce qui nous aidera d'ailleurs à définir celles des courbes d'excrétion et d'utilisation calciques.

a) La première partie de la courbe (régimes I à VI) est assimilable, sans grande erreur, à un arc de parabole.

En effet, appelons I la quantité moyenne de calcium ingérée quotidiennement (en mg) par les animaux des divers lots, et x le taux calcique alimentaire (exprimé en pourcentage). D'autre part, désignons par C la quantité moyenne de nourriture consommée quotidiennement (en grammes de régime sec).

$$I = C \frac{x}{100} \cdot 1000 = 10 Cx \quad (1)$$

Mais, comme le montre la figure 4 (p. 306), C varie de manière sensiblement linéaire avec x . Donc :

$$C = \alpha x + \beta \quad (2)$$

En rapprochant les équations (1) et (2), nous obtenons :

$$I = 10 \alpha x^2 + 10 \beta x \quad (3)$$

A partir des valeurs expérimentales de C pour les lots I à VI, on peut calculer que la courbe correspondante est représentée par l'équation :

$$C = 10,92 x + 6,94 \quad (2a)$$

La droite d'équation (2a) est tracée sur la fig. 4.

L'équation (3) devient donc :

$$I = 109,2 x^2 + 69,4 x \quad (3a)$$

On trouvera dans le tableau VII les valeurs expérimentales et les valeurs calculées de l'ingestion calcique moyenne pour les lots I à VI. L'accord entre les deux séries de valeurs est satisfaisant.

TABLEAU VII

Valeurs expérimentales et valeurs calculées de l'ingestion calcique (lots I à VI).

Lots	Taux calcique alimentaire (x)	Ingestion calcique moyenne	
		déterminée expérimentalement	calculée (I)
	p. 100	mg par jour	mg par jour
I	0,0371	2,76	2,72
II	0,0664	4,80	5,09
III	0,1164	9,47	9,56
IV	0,1664	14,95	14,57
V	0,2664	27,55	26,23
VI	0,4664	54,89	56,12

L'arc de parabole d'équation (3a) est tracé sur la fig. 5.

b) La forme de la seconde partie de la courbe d'ingestion calcique (régimes VI à IX) est plus difficile à définir.

La courbe de consommation dans cette zone apparaissant comme une droite d'équation $C = ax + b$, la courbe d'ingestion est assimilable

en principe, comme dans la première zone, à un arc de parabole. On peut calculer que :

$$C = 1,42 x + 11,17 \quad (2b)$$

D'où l'on déduit :

$$I = 14,2 x^2 + 111,7 x \quad (3b)$$

FIG. 5. — Courbes d'ingestion, d'excrétion et de rétention du calcium (Lots I à VI).

Ici encore, le calcul des valeurs de l'ingestion calcique au moyen de l'équation (3b) donne des valeurs qui s'accordent avec celles de l'expérience (voir le tableau VIII).

TABLEAU VIII

*Valeurs expérimentales et valeurs calculées de l'ingestion calcique
(lots VI à IX).*

Lots	Taux calcique alimentaires (x)	Ingestion calcique moyenne	
		déterminée expérimentalement	calculée (I)
	p. 100	mg par jour	mg par jour
VI	0,4664	54,89	57,83
VII	0,7664	95,14	95,03
VIII	1,0664	134,57	132,23
IX	2,0664	209,79	250,23

2° Excrétion calcique

Nous étudierons successivement l'influence du taux calcique alimentaire sur la valeur de l'excrétion totale et sur l'importance relative des deux voies d'excrétion (voie intestinale et voie rénale).

a) Valeur de l'excrétion totale

Sauf en ce qui concerne les deux premiers régimes, on peut considérer que la quantité totale de calcium excrétée par le jeune Rat augmente régulièrement avec le taux calcique alimentaire (voir plus loin la fig. 13). Cependant, comme la courbe d'ingestion calcique, la courbe d'excrétion se compose de deux parties qui se raccordent pour une abscisse voisine de celle qui correspond au régime VI (0,47 p. 100 de calcium).

La première partie de cette courbe est un arc de parabole. En effet, désignons comme précédemment par I la quantité moyenne de calcium ingérée quotidiennement (en mg) par les animaux des divers lots et par x le taux calcique alimentaire (en pourcentage). De plus, appelons E la quantité moyenne de calcium excrétée quotidiennement (en mg) et R la quantité moyenne de calcium retenue quotidiennement (en mg.)

$$E = I - R \quad (4)$$

Anticipant sur la suite de la discussion, nous signalons que la courbe de rétention $R = f(x)$ est pratiquement une droite d'équation :

$$R = 52,6 x - 0,3$$

En se basant sur l'équation (3a) et sur celle qui précède, l'équation (4) devient :

$$E = 109,2 x^2 + 5,8 x + 0,3 \quad (4a)$$

C'est bien là l'équation d'une parabole. La correspondance entre les valeurs calculées au moyen de cette équation et les valeurs expérimentales de l'excrétion est satisfaisante (voir le tableau IX). La courbe d'équation (4a) est tracée sur la fig. 5.

TABLEAU IX
*Valeurs expérimentales et valeurs calculées
de l'excrétion calcique (lots I à VI).*

Lots	Taux calcique alimentaires (x)	Excrétion calcique	
		déterminée expérimentalement	calculée (E)
	p, 100	mg par jour	mg par jour
I	0,0371	1,09	0,67
II	0,0664	1,16	1,17
III	0,1164	1,81	2,45
IV	0,1664	3,79	4,29
V	0,2564	10,88	9,60
VI	0,4664	25,73	26,76

L'ordonnée à l'origine de la parabole n'est pas nulle. Toutefois, on ne peut déterminer le minimum de l'excrétion calcique au moyen de l'équation (4a) : ce minimum étant très faible, on risquerait ainsi de faire une erreur relative importante.

D'autre part, il n'est pas certain que, pour des valeurs très faibles du taux calcique alimentaire, l'excrétion continue à s'abaisser lorsque ce taux tend vers zéro. Bien au contraire, nous pensons qu'elle tend alors elle-même vers une valeur constante, de l'ordre de 1 mg par jour, qui correspondrait au minimum de l'élimination calcique dans les conditions de l'expérience. Ce problème sera d'ailleurs repris dans le chapitre VI.

Quoi qu'il en soit, nous croyons devoir insister sur la faiblesse de l'excrétion calcique chez le jeune Rat soumis à un régime pauvre en calcium. Dans les conditions où nous nous sommes placé, il est particulièrement difficile d'obtenir, chez le Rat en croissance, une balance calcique négative : pour y parvenir, il faudrait, semble-t-il, que le régime ne renfermât pas plus de 0,010 p. 100 de calcium, ce taux permettant aux animaux d'ingérer environ 1 mg de calcium par jour.

On pourrait évidemment nous objecter que nos recherches ont été de courte durée : qu'advierait-il si des animaux étaient soumis pendant toute la durée de leur croissance active à des régimes hypocalciques ? Nous réservons cette question, qui fait, pour une part, l'objet d'un chapitre ultérieur (chap. VI).

La seconde partie de la courbe d'excrétion (taux calciques alimentaires supérieurs à 0,47 p. 100) peut être considérée comme une droite (voir

plus loin la fig. 13). Il serait possible d'en déterminer l'équation de manière directe, sans passer par celle de la courbe de rétention, dont la forme est d'ailleurs difficile à préciser dans cette zone. Nous ne le ferons pas, cette équation ne devant pas nous servir dans la suite de ce travail.

b) Voies d'excrétion du calcium

Pour tous les lots d'animaux, le calcium fécal est beaucoup plus abondant que le calcium urinaire. Cette constatation confirme un fait connu depuis fort longtemps : quelle que soit l'origine du calcium des fèces, il est bien établi que le tube digestif représente normalement la principale voie d'élimination de cet élément ⁽¹⁾.

Cependant, il est intéressant de noter que l'importance *relative* des deux voies d'excrétion dépend du taux calcique alimentaire.

FIG. 6. -- Variation relative de l'excrétion fécale et de l'excrétion urinaire du calcium en fonction du taux calcique alimentaire

Ca fécal : barres hachurées. -- Ca urinaire : barres non hachurées.

Ca fécal du lot VI = 100 (conventionnellement)

Ca urinaire du lot VI = 100 conventionnellement)

En effet, lorsque ce taux s'accroît, l'excrétion fécale et l'excrétion urinaire du calcium n'évoluent pas parallèlement. Alors que la perte fécale de calcium est déjà nettement accrue chez les animaux du lot III (0,12 p. 100 de calcium), l'excrétion calcique urinaire ne commence à s'élever de manière sensible que lorsque la teneur en calcium du régime atteint près de 0,3 p. 100 : pour les régimes I à V inclus, elle est relativement stable et comprise entre 0 mg, 15 et 0 mg, 20 par jour. La fig. 6 montre bien l'évolution très différente des deux excrétions.

(1) Dès 1909, BENEDICT et MENDEL [9] ont montré que le calcium fécal pouvait représenter chez le Rat jusqu'à 99 p. 100 du calcium total excrété.

3° Rétention calcique

Tant que le taux calcique alimentaire n'est pas trop élevé, la quantité de calcium retenue dans l'organisme est sensiblement *proportionnelle* à ce taux : sur la fig. 13, les points qui représentent la rétention calcique des animaux des lots I à VI sont pratiquement alignés le long d'une droite qui passe au voisinage de l'origine des coordonnées. L'équation calculée de cette droite est :

$$R = 63,6 x - 0,3$$

TABLEAU X

*Valeurs expérimentales et valeurs calculées
de la rétention calcique (lots I à VI).*

Lots	Taux calcique alimentaires (x)	Rétention calcique	
		déterminée expérimentalement	calculée (R)
	p. 100	mg par jour	mg par jour
I	0,0371	1,67	2,06
II	0,0664	3,64	3,92
III	0,1164	7,65	7,10
IV	0,1664	11,17	10,28
V	0,2664	16,52	16,64
VI	0,4664	29,16	29,36

La différence entre les valeurs expérimentales de la rétention et les valeurs calculées au moyen de l'équation précédente est faible (tableau X), sauf lorsque le taux calcique alimentaire est très bas.

Lorsque le taux calcique alimentaire continue à s'élever, la rétention n'augmente plus aussi rapidement (fig. 13). Elle s'accroît cependant encore de manière très nette, de sorte que les animaux soumis au régime IX fixent des quantités de calcium considérables, deux fois et demie supérieures en moyenne à celles que retiennent les sujets du lot VI.

Il est intéressant de noter que, pour les trois derniers régimes, les différences individuelles à l'intérieur de chaque lot deviennent considérables, en valeur absolue comme en valeur relative. Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, il semble donc que les animaux soumis à des régimes exagérément riches en calcium s'adaptent plus ou moins bien ; chez tous, la quantité de calcium fixée est considérable, mais certains sujets éliminent plus difficilement que d'autres l'excès de calcium ingéré.

En raison même de l'ampleur des variations individuelles de la

réten-tion, nous n'avons pas calculé l'équation de la courbe correspondante pour des taux calciques supérieurs à celui qui caractérise le régime VI.

4° Utilisation physiologique du calcium

a) Influence du taux calcique alimentaire sur le coefficient de réten-tion du calcium

Les valeurs du coefficient de réten-tion ($C.R. = \frac{\text{Ca retenu}}{\text{Ca ingéré}} \times 100$) mentionnées dans le tableau VI, ainsi que la fig. 7, montrent que, chez le jeune Rat, le coefficient de réten-tion du calcium dépend de l'apport alimentaire de cet élément : dans les limites de notre expérience, il varie entre 30 et 80 p. 100.

FIG. 7. — Influence du taux calcique alimentaire sur le coefficient de réten-tion du calcium.

Le coefficient de réten-tion atteint sa valeur la plus élevée pour un taux calcique alimentaire de l'ordre de 0,12 p. 100. Le maximum semble assez aigu : dès que le taux calcique s'éloigne dans un sens ou dans l'autre de cette dernière valeur, le coefficient de réten-tion s'abaisse rapidement.

L'abaissement du C. R. pour les taux calciques très faibles est évidemment dû à l'existence d'une excré-tion calcique liminaire.

L'abaissement du C. R. lorsque le taux calcique du régime dépasse 0,12 p. 100 est moins facile à interpréter. *A priori*, on aurait mieux com-

b) Coefficient de rétention et coefficient d'utilisation

Nous avons rappelé dans la première partie de ce travail qu'il existe deux manières d'évaluer l'utilisation physiologique du calcium alimentaire lorsqu'on connaît les quantités de calcium ingérées et éliminées par l'organisme.

Celle que nous avons employée consiste à calculer le « coefficient de rétention » du calcium (bilan calcique) par la formule :

$$C. R. = \frac{\text{Ca ingéré} - \text{Ca excrété}}{\text{Ca ingéré}} \times 100$$

L'autre, proposée par MITCHELL et collab., consiste à soumettre deux groupes semblables d'animaux (ou successivement les mêmes sujets) à deux régimes de taux calciques différents, puis à calculer la proportion du supplément de calcium ingéré lorsqu'on passe du régime le moins riche en calcium (R_2) au régime le plus riche (R_1), que retient l'organisme. Le « coefficient d'utilisation » du calcium se calcule par la formule :

$$C. U. = \frac{[\text{Ca ingéré } (R_1) - \text{Ca ingéré } (R_2)] - [\text{Ca excrété } (R_1) - \text{Ca excrété } (R_2)]}{\text{Ca ingéré } (R_1) - \text{Ca ingéré } (R_2)} \times 100$$

Il nous a semblé intéressant de comparer, chez le jeune Rat, les résultats des deux méthodes de détermination.

Puisque la courbe d'ingestion et la courbe d'excrétion se composent de deux parties qui se raccordent pour un taux calcique alimentaire de l'ordre de 0,5 p. 100, trois cas particuliers peuvent se présenter :

1^{er} cas : les deux niveaux calciques sont inférieurs à 0,5 p. 100.

Soient C_1 et C_2 les points correspondant sur l'axe des abscisses aux deux taux calciques alimentaires choisis, A_1 et A_2 les points qui leur correspondent sur la courbe d'ingestion, B_1 et B_2 les points qui leur correspondent sur la courbe de rétention (fig. 8). Par ailleurs, appelons M et N les projections des points A_1 et B_1 sur $A_2 C_2$.

Le coefficient de rétention pour le niveau calcique le plus élevé est :

$$\frac{B_2 C_2}{A_2 C_2} \times 100$$

Quant au coefficient d'utilisation, il est égal à :

$$\frac{B_2 C_2 - B_1 C_1}{A_2 C_2 - A_1 C_1} \times 100 = \frac{B_2 N}{A_2 M} \times 100$$

Pour que les deux coefficients soient égaux, il faut et il suffit que

$$\frac{B_2 C_2}{A_2 C_2} = \frac{B_2 N}{A_2 M} \quad (1)$$

Appelons O l'intersection du prolongement de la corde $A_1 A_2$ et de la courbe de rétention, et P le projection de O sur $A_2 C_2$. Les triangles $O B_2 P$ et $B_1 B_2 N$ sont semblables, de sorte que :

$$\frac{B_2 N}{B_2 P} = \frac{B_1 N}{OP} \quad (2)$$

FIG. 8

De même, les triangles $A_1 A_2 M$ et $O A_2 P$ étant semblables, on a :

$$\frac{A_2 M}{A_2 P} = \frac{A_1 M}{OP} = \frac{B_1 N}{OP} \quad (3)$$

En rapprochant (2) et (3), on peut écrire :

$$\frac{A_2 M}{A_2 P} = \frac{B_2 N}{B_2 P}, \quad \text{ou} \quad \frac{B_2 N}{A_2 M} = \frac{B_2 P}{A_2 P}$$

La condition (1) devient donc :

$$\frac{B_2 C_2}{A_2 C_2} = \frac{B_2 P}{A_2 P}$$

Ce qu'on peut encore écrire :

$$\frac{B_2 P + P C_2}{A_2 P + P C_2} = \frac{B_2 P}{A_2 P}$$

Les deux rapports précédents ne peuvent être égaux que si $P C_2 = O$. La condition est remplie si la droite qui supporte $A_1 A_2$ rencontre la courbe de rétention sur l'axe des abscisses.

Comme la rétention du calcium pour un taux calcique alimentaire nul est voisine de zéro, il faut pratiquement, pour que la condition précédente soit remplie, que la droite $A_1 A_2$ passe au voisinage de l'origine des coordonnées.

Il est évident que ce n'est pas toujours le cas. Si les deux niveaux calciques utilisés sont tous deux très proches de 0,47 p. 100, la droite $A_1 A_2$ passe assez loin de l'origine des coordonnées : la différence entre les estimations du coefficient de rétention et du coefficient d'utilisation atteint alors un maximum, qu'il est facile de calculer.

Nous avons vu en effet que le coefficient d'utilisation est défini sur la fig. 8 par le rapport $\frac{B_2 N}{A_2 M} \times 100$.

D'autre part, les pentes respectives des droites $A_1 A_2$ et $B_1 B_2$ sont égales à :

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{A_2 M}{A_1 M} \quad \operatorname{tg} \beta = \frac{B_2 N}{B_1 N} = \frac{B_2 M}{A_2 M}$$

Le coefficient d'utilisation s'écrit donc : $\frac{\operatorname{tg} \beta}{\operatorname{tg} \alpha} \times 100$.

Lorsque C_1 tend vers C_2 :

$\operatorname{tg} \beta \rightarrow 63,6$ (pente de la tangente en A_2 à la courbe $R = 63,6x - 0,3$) ;

$\operatorname{tg} \alpha \rightarrow (2 \times 109,2) x + 69,4$ (pente de la courbe $I = 109,2 x^2 + 69,4 x$)

Le coefficient d'utilisation tend donc vers $\frac{63,6}{218,4x + 69,4} \times 100 = 37,1$

A la limite, $x = 0,4664$ et le coefficient d'utilisation calculé au moyen de la formule précédente tend vers 37,1 alors que le coefficient de rétention expérimental est de 53,1 et que sa valeur calculée au moyen des équations $R = f(x)$ et $I = f(x)$ est de 52,3.

On peut objecter que le calcul qui précède est purement théorique, puisque les deux niveaux d'ingestion calcique choisis pour la détermination du coefficient d'utilisation sont toujours très différents. Nous avons donc déterminé diverses valeurs du coefficient d'utilisation en prenant comme taux calcique alimentaire le plus élevé 0,4664 p. 100 et en donnant plusieurs valeurs au taux calcique le plus bas (tableau XI).

Tous les groupes de valeurs cités dans la première colonne peuvent être choisis *pratiquement* pour la détermination du coefficient d'utilisation du calcium : on voit que les premiers conduisent à des estimations nettement inférieures aux résultats fournis par le calcul du C. R. Pour que la différence soit peu importante, il faut que le premier niveau d'ingestion choisi soit faible.

TABLEAU XI

*Valeurs comparées du coefficient d'utilisation
et du coefficient de rétention du calcium*

Taux calcique alimentaires	Coefficient d'utilisation		Coefficient de rétention	
	expérimental	calculé	expérimental	calculé
g p. 100 g	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100
0,35 — 0,4664	—	40,1	53,1	52,3
0,2664 — 0,4664	45,8	42,6		
0,1664 — 0,4664	45,0	46,9		
0,1164 — 0,4664	47,3	47,8		
0,0664 — 0,4664	50,9	49,8		

2^e cas : les deux niveaux calciques sont supérieurs à 0,5 p. 100.

Ce deuxième cas ne présente qu'un intérêt théorique : il ne saurait guère venir à l'idée d'un expérimentateur de déterminer un coefficient d'utilisation calcique avec deux niveaux d'ingestion aussi élevés.

En principe, dans ce cas comme dans le précédent, le coefficient d'utilisation et le coefficient de rétention ne peuvent être voisins que si les deux droites qui joignent les points choisis sur les courbes de rétention et d'ingestion se croisent au voisinage de l'axe des abscisses (c'est-à-dire au voisinage de l'origine des coordonnées, puisque le prolongement de la courbe d'ingestion passe par cette origine). Le petit nombre de points expérimentaux utilisés pour tracer les courbes dans la zone considérée ne permet guère de dire si cette condition peut ou ne peut pas être remplie (fig. 13).

3^e cas : l'un des niveaux calciques est inférieur et l'autre supérieur à 0,5 p. 100.

La condition nécessaire et suffisante pour que coefficient d'utilisation et coefficient de rétention soient voisins reste la même. L'examen de la fig. 13 montre que, dans beaucoup de cas, cette condition n'est pas remplie, le hasard seul en décidant.

En conclusion, on voit que, si les raisons qui ont conduit MITCHELL et son école à critiquer l'évaluation du pouvoir de fixation du calcium des organismes au moyen du coefficient de rétention sont parfaitement valables, la notation qu'ils proposent de lui substituer peut être elle aussi critiquée, puisque les chiffres auxquels elle conduit varient très largement, pour chaque niveau d'ingestion calcique (niveau maximum) avec la valeur du second niveau utilisé (niveau minimum).

Chapitre V

INFLUENCE DU TAUX CALCIQUE ALIMENTAIRE SUR L'ASSIMILATION DU CALCIUM EN PRÉSENCE DE VITAMINES D

I. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

De nombreuses publications ont été consacrées à l'étude de l'influence du taux calcique alimentaire, en présence de vitamine D, sur la calcification des organismes en croissance. Nous ne les citerons pas toutes ici : seuls seront retenus les travaux dont les auteurs se sont attachés, en établissant des relations quantitatives entre le calcium ingéré et le calcium fixé dans l'organisme, à déterminer l'influence du niveau d'ingestion calcique sur l'utilisation physiologique du calcium alimentaire.

Dans le chapitre précédent, on a vu que la seule variable de nos régimes d'expérience est le taux calcique. Certains auteurs ont déjà travaillé dans les mêmes conditions ; mais d'autres ont fait varier simultanément le taux du calcium et celui du phosphore, afin de maintenir constant le rapport Ca/P.

Parmi les premiers, figurent BACHMANN et collab. [7], qui ont comparé l'« absorption calcique » de 3 lots de jeunes rats soumis, pendant 70 jours, à un régime de base renfermant 0,57 p. 100 de phosphore, et — suivant les lots — 0,40, 0,67 ou 1 p. 100 de calcium sous forme de carbonate ; chaque animal a reçu quotidiennement 25 U.I. de vitamine D. La consommation de nourriture a été maintenue dans tous les lots à la même valeur.

On voit sur la fig. 9 que dans la zone explorée, l'accroissement du taux calcique alimentaire entraîne une augmentation appréciable de la quantité de calcium « absorbée » et une diminution très marquée du « coefficient d'absorption ».

Le problème a été repris par ESCUDERO, HERRAIZ et MUSMANNO [39], dont le travail est assez complet, mais peut être critiqué sur plusieurs points. Par dosage du calcium dans l'organisme entier au début et à la fin de l'expérience — dont la durée n'est d'ailleurs pas précisée — les auteurs ont évalué la rétention calcique de 7 lots de jeunes rats soumis à des régimes contenant des quantités variables de calcium (de 0 à 0,23 g. pour 100 calories) sous forme de carbonate ⁽¹⁾ ; la vitamine D a été administrée à dose indéterminée sous forme d'huile de foie de morue. Mais on peut s'étonner que ESCUDERO et collab. considèrent comme nul le taux

⁽¹⁾ ESCUDERO et collab. rapportent toujours la teneur en calcium de leurs régimes alimentaires à 100 calories, et non à 100 grammes [38].

calrique de leur régime de base, dont certains constituants (viande, amidon) contiennent pourtant des quantités de calcium appréciables.

Si l'on admettait que le régime de base ne renferme pas trace de calcium, il faudrait en conclure qu'il n'y a pas de perte calrique minimum ; en effet, en fin d'expérience, la carcasse des animaux soumis à ce

FIG. 9. — Influence du taux calcique alimentaire sur l'« absorption » du calcium (Ca/P variable) (d'après BACHMANN et collab. 1940).

régime renferme une quantité de calcium égale à celle que des animaux de même portée contenaient au début. Dans ces conditions, on ne comprend plus pour quelle raison le coefficient de rétention s'abaisse pour des taux calciques alimentaires très faibles tendant vers 0 (fig. 10).

Quoi qu'il en soit, le travail d'ESCUDERO et collab. conduit à des courbes dont l'allure générale est, dans une zone plus limitée, comparable à certaines courbes que nous avons obtenues en l'absence de vitamine D.

Les résultats des travaux effectués avec des régimes de rapport Ca/P constant ne concordent pas de manière pleinement satisfaisante. Dans ces conditions, FAIRBANKS et MITCHELL [40] ont constaté, chez le jeune Rat, une élévation de la rétention du calcium et un abaissement corrélatif du coefficient de rétention lorsque la teneur en calcium du régime passe de 0,18 à 1,25 p. 100. ESCUDERO et collab. [39] arrivent à

la même conclusion pour des taux calciques alimentaires compris entre 0 et 0,23 p. 100 calories. Il est à noter que, dans le travail de FAIRBANKS et MITCHELL, le coefficient de rétention atteint des valeurs extrêmement élevées (plus de 100 p. 100.) pour les taux calciques les plus faibles et qu'il tombe à 25 p. 100 seulement, chez les sujets soumis au

FIG. 10. — Influence du taux calcique alimentaire sur la rétention du calcium (Ca/P variable) (d'après ESCUDERO et collab., 1945).

régime le plus chargé en calcium. L'imprécision relative de la méthode employée (dosage du calcium dans l'organisme entier d'animaux différents au début et à la fin de l'expérience) peut être responsable de la valeur surprenante atteinte par le coefficient de rétention chez les animaux dont le régime contient 0,18 p. 100 de calcium.

Chez la Souris, BENDANA-BROWN et BROWN [8] ont constaté des faits différents. Avec des régimes de rapport Ca/P toujours élevé (le lait en poudre y est la source essentielle de calcium et de phosphore) contenant de 0,17 à 0,34 p. 100 de calcium, ils ont obtenu d'abord une élé-

vation, puis une *diminution* de la quantité de calcium retenue, le coefficient de rétention ne cessent de s'abaisser (fig. II).

En dépit de ces divergences, tous les auteurs cités plus haut s'accordent pour conclure que, chez l'animal soumis à un régime complet, le coefficient de rétention du calcium varie avec le taux calcique alimentaire

FIG. II. — Influence du taux calcique alimentaire sur la rétention du calcium (Ca/P constant) (d'après BENDANA-BROWN et BROWN, 1947).

et qu'il peut atteindre des valeurs très élevées lorsque ce dernier est faible.

Cependant, ces faits ne paraissent pas admis par tous les physiologistes.

Ainsi, avec deux régimes alimentaires contenant respectivement 0,092 p. 100 et 0,473 p. 100 de calcium et dont la teneur en vitamine D n'est pas précisée, BLAIZOT et DE SACY [12] ont obtenu, chez le Rat, des coefficients de rétention calcique peu différents (57 et 52 p. 100). Leur commentaire est intéressant :

« On aurait pu s'attendre, écrivent-ils, à une rétention d'autant plus élevée que la ration était plus pauvre en calcium ; il semble qu'il n'en soit rien et qu'il existe un *pourcentage maximum* qui ne peut être dépassé.

« Rappelons en effet que les rétentions les plus favorables obtenues par JACQUOT et BERTRAND étaient de 55 p. 100. L'ingestion de calcium comporterait donc un *déficit obligatoire*, même pour des formes réputées très efficaces comme le calcium du lait qui accompagne la caséine brute ».

Ces résultats, très différents des précédents, posent un problème qui sera examiné dans la suite de cette étude. Toutefois, nous voudrions souligner ici que la référence faite par BLAIZOT et DE SACY aux conclusions de JACQUOT et collab. [70], ne nous paraît pas justifiée. En effet, ces derniers auteurs ont étudié, non pas l'assimilation du calcium chez des animaux soumis à des régimes de taux calcique variés, mais l'utilisation du calcium de divers sels pour des niveaux d'ingestion calcique non précisés, mais qui semblent *tous élevés* : le fait que le coefficient de rétention du calcium atteint seulement 55 p. 100 dans le cas le plus favorable n'apporte donc aucun argument à l'appui des faits observés par BLAIZOT et DE SACY.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

A. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Le protocole expérimental a été calqué très étroitement sur celui de nos recherches antérieures, exposées dans le chapitre IV.

La différence essentielle entre les deux séries de recherches tient dans l'incorporation, aux nouveaux régimes, d'une quantité standard de vitamine D, soit 300 unités internationales p. 100 g, sous forme de 7-déhydrocholestérol irradié en solution dans l'huile d'olive. Ce taux vitaminique est celui que Mc COY [94], qui a compilé les résultats cités à ce point de vue dans la littérature, recommande d'utiliser lorsque le régime alimentaire du Rat n'est pas parfaitement équilibré du point de vue phospho-calcique.

D'autre part, le taux calcique de l'un des régimes (régime VII *bis*) a été modifié : au lieu d'atteindre 0,766 p. 100 comme celui du régime VII, il a été abaissé à 0,666 p. 100. En effet, étant donné l'intérêt particulier des résultats obtenus dans la « zone » de taux calciques voisins de 0,5 p. 100, il nous a semblé préférable de resserrer l'intervalle de taux calciques qui sépare les régimes VI et VII dans l'expérience précédente.

C'est donc avec les neuf régimes suivants que nous avons travaillé :

Régime		CO ₃ Ca ajouté (p. 100)	Teneur en calcium (p. 100)
I bis		0	0,037.1
— II bis		0	0,066.4
— III bis		0,125	0,116.4
— IV bis		0,250	0,166.4
— V bis		0,500	0,266.4
— VI bis		1	0,466.4
— VII bis		1,500	0,666.4
— VIII bis		2,500	1,066.4
— IX bis		5	2,066.4

B. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Le comportement des 36 animaux a été normal pendant toute la durée de l'expérience : aucun trouble de carence calcique n'a été observé. La diminution de l'appétit obtenue en l'absence de vitamine D chez les animaux soumis aux régimes les plus pauvres en calcium, est ici très atténuée, si même elle existe (fig. 12).

FIG. 12. — Influence du taux calcique alimentaire et de la vitamine D sur la consommation de nourriture.

Les quantités de calcium ingérées, excrétées et retenues, ainsi que les valeurs du bilan, sont indiquées dans le tableau XII. Les notations utilisées demeurent les mêmes que dans le chapitre précédent.

TABLEAU XII

(1^{re} partie)

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en présence de vitamine D*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	$\frac{\text{Ca fécal}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	$\frac{\text{Ca urin.}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	p. 100	p. 100
<i>Rég. I bis (0,037 % Ca) :</i>									
Rat 1	+ 33	41,48	8,52	1,79	10,31	31,17	82,6	17,36	75,1
Rat 2	+ 35	43,48	8,98	2,18	11,16	32,32	80,5	19,53	74,3
Rat 3	+ 33	39,98	13,46	2,60	16,06	23,92	83,8	16,19	59,8
Rat 4	+ 47	47,12	16,81	3,55	20,36	26,76	82,6	17,44	56,8
Moyennes		43,01	11,94	2,53	14,47	28,54	82,4	17,6	66,5
<i>Rég. II bis (0,066 % Ca) :</i>									
Rat 5	+ 40	87,11	7,56	2,54	10,10	77,01	74,8	25,15	88,4
Rat 6	+ 34	76,58	9,74	2,54	12,28	64,30	79,3	20,68	84,0
Rat 7	+ 32	57,71	3,87	1,56	5,43	52,28	71,3	28,73	90,6
Rat 8	+ 45	91,00	6,31	2,44	8,75	82,25	72,1	27,88	90,4
Moyennes		78,10	6,87	2,27	9,14	68,96	74,4	25,6	88,3
<i>Rég. III bis (0,116 % Ca) :</i>									
Rat 9	+ 34	157,95	11,86	1,99	13,85	144,10	85,6	14,36	91,2
Rat 10	+ 37	150,94	16,35	3,97	19,32	131,32	79,4	20,55	87,2
Rat 11	+ 49	150,41	9,71	3,23	12,94	143,47	75,0	24,96	91,7
Rat 12	+ 22	146,64	13,08	3,28	16,20	130,44	79,7	20,25	88,9
Moyennes		152,91	12,75	3,12	15,87	137,33	80,3	19,7	89,8

TABLEAU XII

(2^e partie)

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en présence de vitamine D*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	$\frac{\text{Ca fécal}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	$\frac{\text{Ca urin.}}{\text{Ca excr.}} \times 100$	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	p. 100	p. 100
<i>Rég. IV bis (0,166 % Ca) :</i>									
Rat 13	+ 34	188,77	11,46	1,63	13,09	175,68	87,5	12,45	93,1
Rat 14	+ 37	204,89	15,55	2,03	17,58	187,31	88,4	11,55	91,4
Rat 15	+ 49	223,87	10,17	2,28	12,45	211,42	81,7	18,31	94,4
Rat 16	+ 32	169,07	10,24	1,45	11,69	157,38	87,6	12,40	93,1
Moyennes		196,50	11,87	1,85	13,70	182,9	86,3	13,7	93,0
<i>Rég. V bis (0,266 % Ca) :</i>									
Rat 17	+ 37	316,6	32,8	3,54	36,3	280,3	90,2	9,75	88,5
Rat 18	+ 45	360,0	27,8	4,90	32,7	327,3	85,0	14,98	90,9
Rat 19	+ 33	304,3	25,0	3,73	28,7	275,6	87,0	13,00	90,6
Rat 20	+ 55	391,6	28,5	4,35	32,8	358,8	86,7	13,26	91,6
Moyennes		343,1	28,5	4,13	32,6	310,5	87,2	12,7	90,4
<i>Rég. VI bis (0,466 % Ca) :</i>									
Rat 21	+ 48	665,7	290,6	24,35	314,9	350,8	92,3	7,73	52,7
Rat 22	+ 47	638,2	253,4	8,77	262,2	376,0	96,7	3,34	58,9
Rat 23	+ 47	600,6	234,9	10,42	245,3	355,3	95,7	4,25	59,1
Rat 24	+ 54	676,8	227,6	6,59	234,2	442,6	97,2	2,81	65,4
Moyennes		645,3	251,6	12,53	264,1	381,2	95,5	4,5	59,0

TABLEAU XII

(3^e partie)

*Influence du taux calcique alimentaire
sur l'utilisation physiologique du calcium en présence de vitamine D*

Régimes et animaux	Gain de poids	Ca ingéré	Ca fécal	Ca urinaire	Ca tot. excr.	Ca retenu	Ca fécal Ca excr. $\times 100$	Ca urin. Ca excr. $\times 100$	Bilan calcique
	g	mg	mg	mg	mg	mg	p. 100	p. 100	p. 100
<i>Rég. VII bis (0,666 % Ca)</i>									
Rat 25	+ 46	832,3	367,0	5,43	372,4	459,9	98,5	1,46	55,2
Rat 26	+ 35	696,3	360,5	7,95	368,4	327,9	97,8	2,16	47,1
Rat 27	+ 47	898,7	578,1	8,12	586,2	312,5	98,6	1,38	34,8
Rat 28	+ 49	876,7	529,6	6,66	536,3	340,4	98,8	1,24	38,8
<i>Moyennes</i>		826,0	458,8	7,04	465,8	380,2	98,4	1,6	44,0
<i>Rég. VIII bis (1,066 % Ca) :</i>									
Rat 29	+ 49	1361,2	996,7	29,41	1026,1	335,1	97,1	2,87	24,6
Rat 30	+ 43	1317,2	969,9	31,55	1001,4	315,8	96,8	3,15	24,0
Rat 31	+ 42	1291,1	915,9	31,18	947,1	344,0	96,7	3,29	26,6
Rat 32	+ 43	1299,4	961,1	31,28	992,4	307,0	96,8	3,15	23,6
<i>Moyennes</i>		1317,2	960,9	30,85	991,7	325,5	96,9	3,1	24,7
<i>Rég. IX bis (2,066 % Ca) :</i>									
Rat 33	+ 42	2725,8	2404,0	17,39	2421,4	304,4	99,3	0,72	11,2
Rat 34	+ 49	2940,5	2538,3	59,55	2597,8	342,7	97,7	2,29	11,6
Rat 35	+ 42	2671,8	2234,9	15,06	2250,0	421,8	99,3	0,67	15,8
Rat 36	+ 36	2539,5	2010,3	79,97	2090,3	449,2	96,2	3,82	17,7
<i>Moyennes</i>		2719,4	2296,8	42,99	2339,7	379,5	98,1	1,9	14,1

III. — DISCUSSION

1^o Ingestion calcique

Bien que l'influence du taux calcique alimentaire sur l'appétit ne soit pas nette, nous pouvons supposer par analogie avec les faits observés chez les animaux qui ne reçoivent pas de vitamine D, que la quantité de nourriture consommée C varie linéairement avec le taux calcique alimentaire x , tant que celui-ci ne dépasse pas 0,5 p. 100. Cette supposition paraît justifiée par la fig. 12.

L'équation de la courbe de consommation dans la zone A est donc :

$$C = 4,70 x + 11,62$$

Celle de la courbe d'ingestion calcique dans la même zone est :

$$I = 47,0 x^2 + 116,2 x$$

Le premier paramètre est relativement faible : l'arc de parabole se con-

fond presque avec un segment de droite. Les valeurs expérimentales de l'ingestion et les valeurs calculées au moyen de l'équation précédente sont indiquées dans le tableau XIII : l'accord apparaît satisfaisant.

Pour les taux calciques plus élevés, on ne peut indiquer avec précision la forme, et *a fortiori* l'équation de la courbe d'ingestion. Nous nous contenterons de souligner que, pour les trois derniers régimes, les quantités de calcium ingéré avec ou sans vitamine sont pratiquement identiques (fig. 13).

TABLEAU XIII

*Valeurs expérimentales et valeurs calculées de l'ingestion calcique
(lots I bis à VI bis)*

Lots	Taux calcique alimentaire	Ingestion calcique moyenne	
		déterminée expérimentalement	calculée (I)
	p. 100	mg par jour	mg par jour
I bis.....	0,9371	4,30	4,37
II bis.....	0,6664	7,81	7,92
III bis.....	0,1164	15,29	14,17
IV bis.....	0,1664	19,65	20,63
V bis.....	0,2664	34,31	34,28
VI bis.....	0,4664	64,53	64,41

2° Excrétion calcique

a) Valeur de l'excrétion calcique totale

Ainsi que le montre la fig. 13, la vitamine D modifie profondément la courbe d'excrétion calcique.

Pour les quatre premiers lots, l'excrétion calcique moyenne est très faible : avec des irrégularités qui sont dûes elles-mêmes à l'importance des variations individuelles à l'intérieur de chaque lot, elle demeure comprise entre 0,9 mg et 1,6 mg par jour. L'excrétion calcique minimum paraît donc du même ordre de grandeur qu'en l'absence de vitamine D. Mais alors que, dans ce dernier cas, la quantité de calcium éliminée s'accroît très vite lorsque le taux calcique alimentaire s'élève, elle demeure ici à peu près stable tant que le taux calcique ne dépasse pas 0,17 p. 100.

Pour les taux calciques plus élevés, la perte calcique s'accroît. La pente de la courbe augmente rapidement, de sorte que l'excrétion rejoint assez vite celle des animaux privés de vitamine D. Dans une zone limitée approximativement par des taux calciques alimentaires de 0,4-0,5 p. 100 et 1 p. 100, les deux courbes d'excrétion (avec et sans vitamine D) sont très voisines.

FIG. 13. — Influence du taux calcique alimentaire sur les quantités de calcium ingérées, excrétées et retenues (en 10 jours).

Enfin, on se trouve en présence d'un phénomène assez surprenant : pour le taux calcique le plus élevé (régime IX *bis*), la quantité de calcium éliminée est beaucoup plus importante chez les animaux qui reçoivent de la vitamine D que chez ceux qui n'en reçoivent pas. La signification de ce phénomène sera discutée dans le paragraphe consacré à la rétention du calcium.

b) Voies d'excrétion du calcium

Mais la vitamine D ne modifie pas seulement la courbe d'excrétion calcique. A taux calcique alimentaire égal, elle augmente également l'importance relative de la perte urinaire (fig. 14).

FIG. 14. — Importance relative de l'excrétion calcique urinaire.

○ en l'absence de vitamine D,

⊠ en présence de vitamine D.

Chez les animaux dont le régime est pauvre en calcium, cet effet est d'une particulière netteté. Il paraît dû, pour une part, à une diminution de l'élimination fécale du calcium — pour une autre, à une augmentation de l'excrétion urinaire. Cependant, si la diminution de l'élimination fécale sous l'influence de la vitamine D est indéniable, nous ne serons pas aussi affirmatif en ce qui concerne l'élévation de l'excrétion urinaire. En effet, les variations individuelles de cette excrétion sont souvent considérables et risquent d'enlever toute signification précise aux valeurs moyennes. De plus, nous verrons que les recherches qui font l'objet du chapitre

suivant ne confirment pas l'existence d'un accroissement de l'élimination urinaire du calcium sous l'influence de la vitamine D.

La fig. 14 montre d'autre part que, pour les taux calciques les plus élevés, la proportion de calcium excrété par le rein subit un léger relèvement. Cet effet, que nous retrouverons, est dû à une forte augmentation de la perte calcique urinaire chez les animaux soumis à un régime excessivement riche en calcium.

3° Rétention calcique

On voit sur la fig. 13 que l'effet de la vitamine D sur la rétention du calcium dépend du taux calcique alimentaire.

Tant que ce taux n'est pas très élevé, la vitamine favorise la rétention du calcium : le bénéfice que l'organisme peut en tirer est considérable puisque, pour les animaux des lots I à V, la quantité fixée à taux calcique alimentaire égal est accrue sous l'influence de la vitamine dans une proportion comprise entre 60 et 100 p. 100. Cet accroissement est dû pour une part à l'augmentation de la quantité de calcium ingéré sous l'influence de la vitamine D. Toutefois, cet effet est secondaire par rapport à l'effet direct de la vitamine D sur la rétention calcique. Dans la zone correspondante, la courbe de rétention est une droite d'équation :

$$R = 121,1 x - 1,25$$

Mais lorsque le taux calcique alimentaire dépasse 0,27 p. 100, l'accroissement de la rétention du calcium se ralentit. Le phénomène se produit plus tôt qu'en l'absence de vitamine, de sorte que les deux courbes de rétention tendent à se rapprocher.

Enfin, lorsque la teneur du régime en calcium continue à augmenter, la quantité de calcium retenue pendant la durée du bilan devient indépendante de l'alimentation : malgré une valeur un peu aberrante, on peut considérer que, pour les lots VI *bis* à IX *bis*, elle est stabilisée au maximum (35 à 40 mg par jour).

Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, il semble donc que la vitamine D se comporte moins comme un facteur de fixation du calcium que comme un facteur de régulation du métabolisme calcique, capable aussi bien d'augmenter le pouvoir de fixation du calcium de l'organisme lorsque l'alimentation est pauvre en cet élément que d'en limiter la rétention à une valeur maximum lorsque le régime en est exagérément chargé (1).

(1) On pourrait nous objecter que les expérimentateurs qui ont étudié jusqu'ici l'effet de la vitamine D sur le métabolisme du calcium ont toujours constaté qu'elle en favorise la rétention, jamais qu'elle la diminue. La raison en paraît simple : jamais l'effet de la vitamine D n'a été étudié, croyons-nous, avec des régimes aussi riches en calcium que nos régimes IX et IX *bis*.

4^o Utilisation physiologique du calcium

a) Influence du taux calcique alimentaire sur le coefficient de rétention du calcium

En présence de vitamine D comme en l'absence de cette vitamine, le C. R. du calcium dépend du taux calcique alimentaire. Mais il varie ici entre des limites plus éloignées encore : 15 et 95 p. 100 au lieu de 30 et 90 p. 100.

On peut distinguer trois zones sur la courbe de la figure 15.

FIG. 15. — Influence du taux calcique alimentaire et de la vitamine D sur le coefficient de rétention du calcium.

Dans la première zone (zone A), la vitamine exerce sur l'utilisation du calcium une action favorable qui se traduit d'une triple manière :

- amélioration du coefficient de rétention du calcium ;
- augmentation du C. R. maximum, qui passe de 81 à 95 p. 100, en se déplaçant d'ailleurs légèrement ;
- étalement de la zone du maximum.

Ce dernier point nous paraît important : en effet, tandis qu'en l'absence de vitamine D, le C. R. s'abaisse alors que la rétention calcique est encore très faible (moins de 10 mg par jour), en présence de vitamine D cet abaissement ne se produit qu'au moment où la quantité de calcium retenue (30 mg par jour) cesse de s'accroître rapidement. Il n'est pas interdit de penser que c'est un phénomène de ce genre qui explique les résultats obtenus par BLAIZOT et De SACY [12] dans l'étude que nous avons résumée au début de ce chapitre.

Dans la deuxième zone (zone B), la vitamine D ne modifie pas sensiblement le coefficient de rétention du calcium.

Enfin, dans la dernière zone (zone C), elle abaisse fortement le coefficient de rétention qui, en son absence, semblait tendre vers la stabilisation. Pour le lot IX *bis*, l'influence de la vitamine D est considérable, puisqu'elle fait tomber le C. R. de 28 à 14 p. 100.

b) Coefficient de rétention et coefficient d'utilisation

Nous avons montré dans le chapitre précédent à quelles conditions le coefficient d'utilisation du calcium peut être égal au C. R. Ces conditions restent les mêmes lorsque le régime contient de la vitamine D. Nous ferons seulement remarquer :

— que les deux coefficients sont nécessairement voisins lorsque les deux taux calciques alimentaires utilisés pour l'évaluation du coefficient d'utilisation sont inférieurs à 0,27 p. 100. En effet, la courbe d'ingestion calcique est assez voisine d'une droite passant par l'origine des coordonnées (puisque l'influence du taux calcique alimentaire sur l'appétit est peu marquée) et la courbe de rétention est une droite passant au voisinage de l'origine ;

— que les deux coefficients sont très différents lorsque l'un des taux calciques alimentaires est supérieur à 0,27 p. 100 (à moins que l'autre ne soit presque nul) ;

— que les deux coefficients sont toujours très différents si les deux taux calciques alimentaires sont supérieurs à 0,27 p. 100.

(A suivre)