

Bilans non nuls du calcium, du phosphore et du cuivre chez le homard

par

C. Louis KERVAN

INTRODUCTION

J'ai montré, dans le n° 797 (juillet-août 1968) de la *Revue de Pathologie Comparée et de Médecine Expérimentale* qu'en surcharge magnésienne, chez des souris, le poids total du calcium et du phosphore, fixés et excrétés, était plus élevé que chez des témoins ne recevant pas un supplément de magnésium.

Déjà, dans une thèse, le professeur LAVOLLAY avait montré que des rats en surcharge magnésienne fixaient plus de calcium que des témoins en carence magnésienne. J'ai obtenu, en une semaine, pour l'augmentation du calcium, une valeur totale supérieure de 47 % à celle que notait LAVOLLAY en quatre semaines (il n'avait pas dosé le phosphore). Cette différence sensible s'explique parce que LAVOLLAY n'avait tenu compte que du calcium fixé par les animaux, tandis que j'avais dosé aussi les excréments. Cela montrait que les animaux excrétaient du calcium, ce qui est bien connu de tous ; mais ce calcium, fixé ou excrété, ne pouvait venir en totalité de la nourriture : l'ingestion de magnésium était donc à l'origine de la formation endogène de ce calcium supplémentaire.

J'ai pu vérifier ce phénomène par une toute autre voie, en conduisant des recherches sur la formation de la carapace des homards, poursuivie pendant plus de deux ans.

Là encore, la surcharge magnésienne a abouti à une augmentation du calcium, à la fois dans l'eau et dans les animaux ; ces derniers ont donc rejeté du calcium sous une forme soluble, non retenue par le filtre, de sorte que leur eau s'est enrichie en calcium.

Il y a là un recoupement de plus pour montrer que, chez l'animal, le calcium est lié au magnésium. Il y a une importante littérature à ce sujet, mais les expériences ne m'ont pas semblé avoir toujours été conduites de façon à établir des bilans nets, et c'est pourquoi

j'ai cru utile de faire une recherche sur le homard, élevé en bac, où l'eau reste en circuit fermé, filtrée et aérée, mais non renouvelée, de sorte qu'il n'y a aucun apport d'éléments minéraux autres que par le milieu ambiant, bien délimité, et sans possibilité d'apport de l'extérieur, ou de départ ; on sait ainsi au début de l'expérience de quel stock total d'éléments minéraux on dispose ; une analyse en fin d'expérience permet alors un bilan indiscutable.

J'ai indiqué dans la *Rev. Génér. des Sciences*, juillet 1960, des bilans de magnésium et de calcium sur l'homme et il est certain que sur l'homme, comme sur l'animal, il convient de reconsidérer à ce sujet bien des aspects auparavant admis pour des métabolismes qui montrent que l'organisme ne se contente pas de simples échanges chimiques.

PROTOCOLE DES EXPERIENCES

Une première série d'expériences fut faite en 1967-68, une seconde en 1968-69, qui confirmait et complétait la première.

Le principe était le suivant : prendre des homards de même sexe (j'ai pris des mâles), de même taille, de même poids, ce qui rend très probable qu'ils sont sensiblement de même âge, donc d'activité métabolique voisine (ce n'est pas toujours facile à trouver, et il faut alerter d'avance des pêcheurs et des mareyeurs spécialisés). Les animaux sont mis chacun dans un bac d'eau de mer naturelle.

Grâce à l'obligeance de M. Gwenaél BOLLORÉ, j'ai pu disposer à son Centre Océanographique d'Odet, près de Quimper, de bacs pouvant recevoir 70 litres d'eau, plus 5 litres dans le filtre accolé (filtre au charbon de bois activé, dans un matelas de soie de verre). L'eau, par un siphon en matière plastique, passe sur le filtre et revient au bac (vases communicants) ; c'est donc 75 litres au total qui circulent. Une

pompe à air assure le renouvellement en oxygène (comme dans les aquariums).

Les animaux sont laissés dans ces bacs et nourris jusqu'à ce qu'ils fassent leur mue. J'ai pris des homards d'environ 200 grammes, plus parfois ; à cette taille ils font environ deux mues par an. A la mue achevée, un animal est sorti de son bac, essuyé, pesé ; puis il est séché à 105° C, incinéré à 500° C et on dose les éléments dont on recherche le bilan : c'est l'animal-témoin. J'ai retenu pour cette étude le calcium, le phosphore et le cuivre. Lorsqu'un autre animal fait sa mue, on le sort du bac, on l'essuie, on le pèse, puis on le plonge dans un autre bac, où de l'eau, spécialement préparée, est tenue prête.

Eau

Le calcium de l'eau de mer de ce bac a été précipité par addition d'acide chloranilique, son pH rajusté à la soude (c'est une opération délicate, très longue pour être bien menée ; la dernière fois elle m'a pris six mois et je ne puis entrer ici dans les détails opératoires). Je n'ai cependant pas obtenu la précipitation totale du calcium : il restait 50 mg/l de Ca (peut-être lié à des complexes organiques du plancton et non solubles à cet acide ?) ; la précipitation de Ca ne se fait qu'entre les pH 5 et 7, mais il ne m'a pas semblé indiqué d'ajouter une solution-tampon, aux conséquences biologiques peut-être nocives.

Cette précipitation de Ca faite, il fut ajouté un mélange de 2/3 de $MgCl_2$ et 1/3 de $MgSO_4$ (c'est à peu près la proportion de ces sels dans l'eau de mer). Je faisais passer Mg de 1,27 g/l à 2,87 g/l par cette addition (donc Mg était plus que doublé). Le pH fut finalement ajusté alors à 7,3 (ce qui prit des semaines, car il migra lentement, sous l'effet d'un apport d'acide ou de base, d'où la longue durée d'une opération sur 75 litres ; la décantation de l'eau est difficile aussi du fait que le calcium précipité est sous forme colloïdale et il faut terminer par un long filtrage. C'est dans cette eau, assez peu biologique (du fait peut-être de certains chloranilates alcalins solubles qui y restent ?) que l'on mit l'animal sitôt après sa mue. Le moins qu'on puisse dire est que ce milieu ne lui plaît pas et qu'il y manque de vigueur, mais un essai préalable sur des crevettes avait montré que la vie y était possible.

PREMIERE SERIE D'EXPERIENCES

1967-1968

Un animal y a été laissé 13 jours, sans lui

donner à manger. Puis il a été retiré, incinéré, analysé. Voici les résultats pour Ca, P, Cu :

	A la mue	13 jours après
Ca ..	0,390 g	2,090 g = + 1,70
P	0,270	0,300 = + 0,030
Cu ..	0,0024	0,0030 = + 0,0006

Ainsi, dans l'animal, en 13 jours, Ca augmente et devient 5,3 fois plus important ; P augmente de 11 % et Cu de 25 %.

Du fait de l'absence d'une vérification sur la teneur résiduelle en Ca après précipitation, le bilan de Ca dans l'eau me parut peu sûr : cette teneur avait été calculée par extrapolation à partir d'essais sur de petites quantités d'eau et je préférerais tout recommencer, ce qui me prit plus d'un an.

Je ne pouvais tirer des conclusions sûres que pour le phosphore et le cuivre qui, eux, n'ayant pas été précipités, se trouvaient sans modification entre l'eau brute et l'eau traitée, à la mise en bac de l'animal dans cette dernière dès la fin de sa mue. Il était donc facile de connaître le total de P et de Cu dans les 75 litres d'eau de mer brute.

Il fut trouvé dans l'eau 0,072 mg/l de P (valeur élevée, mais possible le long des côtes, où l'eau avait été prélevée ; la littérature donne des valeurs plus élevées parfois). La teneur en cuivre était de 0,0035 mg/l de Cu, aussi très variable selon l'endroit du prélèvement, sa profondeur, la saison, etc. Nous disposions de recoupements consécutifs à des analyses faites par d'autres laboratoires océanographiques de Bretagne ; la valeur que nous avons trouvée est très faible. La littérature spécialisée donne, pour la Bretagne (Manche) des valeurs de 0,090 et 0,060 mg/l qui nous paraissent exceptionnellement élevées ; le plus souvent il est indiqué de 0,010 à 0,025 et la moyenne pour un grand nombre de mesures, sur la Manche, est de 0,013 mg/l. Or, pour la côte sud de Bretagne, nous avions, cette fois, environ trois fois moins : 0,0035, valeur qui ne saurait être prise comme moyenne puisque les teneurs sont variables et qu'il ne s'agit là que d'un échantillon ; c'est seulement, pour cette expérience, une donnée de départ, qui fut différente pour la seconde expérience.

Compte tenu de ces valeurs, nous voyons que 75 litres d'eau contiennent 5,4 mg de P et 0,2625 mg de Cu.

L'augmentation de P dans le homard était de 30 mg ; eut-il utilisé tout le P du bac que cet accroissement eut été impossible s'il n'y avait pas fabrication de phosphore par l'animal

Pour le cuivre, même constatation puisque nous avons 0,60 mg de plus dans l'animal alors que dans l'eau il n'y a que 0,26 mg et dans l'animal il y a une augmentation de 2,2 fois plus de cuivre que le total de ce qu'il y avait dans l'eau.

De ce fait, nous estimions la démonstration convaincante : que l'animal utilise le phosphore et le cuivre de l'eau en totalité, en partie, ou pas du tout, il y a production endogène de P et de Cu, ce qui fait qu'il nous avait paru inutile de doser ces éléments dans l'eau restante, après la sortie de l'animal à analyser.

DEUXIEME SERIE D'EXPERIENCES

Toutefois il nous a semblé qu'il serait intéressant d'avoir un bilan complet de ces éléments, donc pas seulement dans l'animal, mais dans le total eau + animal. Du fait d'un doute à propos du calcium, signalé ci-dessus, nous décidions de recommencer le tout et cette fois de doser ces éléments non seulement dans l'animal, mais dans l'eau, au début et à la fin de l'expérience.

L'eau, captée comme la première fois, au large des côtes, entre Concarneau et Bénodet vers Beg-Meil — mais à une autre saison, était de composition assez différente en P et en Cu, organiquement liés au plancton et la composition planctonique de l'eau varie avec beaucoup de facteurs, de sorte qu'à des époques différentes, bien que prélevée sensiblement au même endroit, on n'a jamais la même composition d'eau de mer ; les variations relatives des principaux sels solubles sont cependant beaucoup moins importantes.

La précipitation du calcium, l'ajustage du pH (qui nous fut facilitée par la présence sur place de l'ingénieur chimiste J. GUÉGUEN, du laboratoire des Etablissements BOLLORÉ), puis la filtration, prirent six mois, et tous les dosages utiles furent effectués. De nouveaux animaux furent alors réunis (un peu plus grands que dans l'expérience précédente). Les mues commencèrent en octobre ; un animal, dès sa mue, fut placé dans l'eau préparée, comme indiqué précédemment et laissé sans manger ; il y vécut 17 jours, puis on l'analysa.

BILAN DU CALCIUM

	A la mue	17 jours après
Dans les 75 l d'eau.	3,75 g	13,5575 g
Dans l'animal	0,56	1,90
	4,31	15,4575

Le calcium a augmenté beaucoup, puisqu'il devient au total 3,5 fois plus élevé (3,6 fois plus dans l'eau et 3,4 fois plus dans le homard).

Les analyses de Ca ont été faites par des méthodes différentes, chacune répétée plusieurs fois. Pour plus de sûreté, je faisais refaire les analyses par deux laboratoires différents ; les écarts furent faibles car il fut tenu compte, pour le choix des méthodes, du rapport très élevé Mg/Ca dans cette eau et les valeurs ci-dessus sont des moyennes, avec peu de dispersion.

Ce bilan du calcium ne doit pas nous surprendre ; il était prévisible d'après nos recherches antérieures, sur les souris par exemple. Ici, le homard fabrique du calcium dont il retient une partie et rejette l'autre, sous forme soluble, non retenue par le filtre, ce qui fait que l'eau s'enrichit en calcium. Bien entendu une telle expérience demanderait à être reproduite un grand nombre de fois, par d'autres ; je ne prétends donner ici rien d'autre qu'un exemple, un échantillon montrant le sens dans lequel il convient de la conduire.

BILAN DU PHOSPHORE

	A la mue	17 jours après
Dans les 75 l d'eau	0,1575 mg	0,1425 mg
Dans le homard	380,0	430,0
	380,1575	430,1425

Le phosphore a augmenté de 13 % dans l'animal en 17 jours.

Il saute aux yeux de suite que la teneur totale de l'eau en P est très faible, insignifiante par rapport à ce que fabrique l'animal qui n'a pas pu trouver son augmentation de P de 50 mg dans les 0,15 mg qu'il y avait au total dans l'eau, ce qui est une augmentation de plus de 300 fois ce que contenait l'eau. Le dosage de P fut fait par les méthodes classiques et recoupé par un contrôle effectué par deux laboratoires (méthodes par complexométrie céru-léomolybdique, ou par acide ascorbique + acide sulfomolybdique, ou par Feigh-Gilles à l'acide phosphomolybdique + acétate de benzidine, etc.), chaque analyse étant répétée plusieurs fois ; ce sont les moyennes que nous avons retenues, la dispersion était faible. Nous avons tenu à un recouplement par plusieurs laboratoires, car la valeur d'abord trouvée nous avait paru très basse, bien plus basse que dans l'eau utilisée l'année précédente ; mais

devant la convergence il fallut bien se rendre à l'évidence et il ne pouvait y avoir de doute sur cette valeur.

En général, très au large, la plupart des auteurs admettent que la teneur en P peut descendre jusqu'à 0,010 mg/l et, près des côtes, on a trouvé jusqu'à 0,100 mg/l. Or, ici, nous n'avions, en moyenne, que 0,021 mg/l, soit 1/5 des minima déjà signalés ; mais nous ne pouvions que noter le fait, d'autant plus que la moyenne des divers dosages de l'eau en fin d'expérience ressortait à 0,019 mg/l. La teneur la plus élevée nous a été donnée par un laboratoire officiel à qui nous demandions une confirmation supplémentaire ; il n'a pu nous garantir l'exactitude des dosages à 0,1 gamma/litre près et plusieurs essais lui font placer la moyenne vers $2,7 \pm 0,2$ gammas, mais toujours il y avait moins de 0,003 mg/l. Même au maximum, improbable, de 0,0029 mg/l, on voit que pour 75 litres d'eau, on aurait 0,2175 mg de P au total, valeur sans commune mesure avec l'augmentation de 50 mg dans le homard.

Une autre constatation : à 0,1 gamma/litre près $0,002 \pm 0,0001$ mg/l, la teneur en P (moyenne des lectures) n'a pas changé dans l'eau. Ce qui est apparu dans le homard ne saurait donc, même en partie, être prélevé dans l'eau.

Nous retrouvons ici un résultat du même ordre que celui signalé par le professeur japonais H. KOMAKI (v. Rev. de Pathol Compar. et de Médec. Expér. de mars-avril 1969) : dans une culture de bactéries de dégradation de l'urée, le phosphore, dans la matière sèche, est proche de 2,1 fois le poids de P qui était au total au départ, dans le milieu de culture. Or, après centrifugation de cette matière, née de l'incubation pendant 3 jours, il constata que le liquide restant n'avait pas varié en P.

Nous sommes donc devant des convergences, et il y a là un phénomène digne de retenir l'attention, en présence de carences en phosphore.

Nota. — Pour les chercheurs qui reproduiraient de telles expériences, je me dois de signaler que j'ai eu un flacon d'eau (heureusement que j'avais fait des prélèvements multiples, dans des flacons de matériaux divers) où je constatais une teneur aberrante de P (de l'ordre de 100 fois les prévisions) ; ce fut confirmé par diverses recherches comparatives. Je suis à peu près certain que c'est la nature du plastique du flacon dans lequel était cette eau qui est en cause, car on

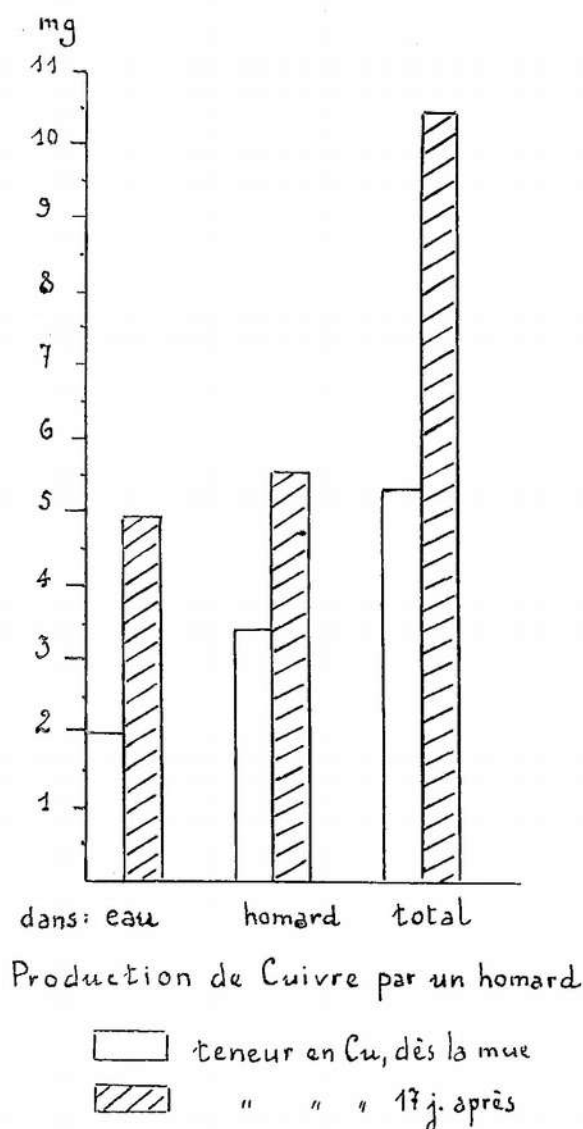
sait que pour certaines qualités de matières plastiques, on utilise comme plastifiant un composé organique du phosphore. Lorsqu'on n'est pas sûr de l'absence de phosphore dans le plastique utilisé (il n'y en a jamais dans le polyéthylène à haute pression par exemple) quand on doit doser P, n'utiliser que du verre ou du pyrex. A signaler aussi que dans les filtres, il ne faut utiliser que du charbon actif activé à la vapeur d'eau, car il existe certaines qualités (de plus en plus rares) où l'activation est faite à l'acide phosphorique, ce qui peut fausser les résultats.

BILAN DU CUIVRE

Il était intéressant de voir le bilan du cuivre, élément important de l'échange d'oxygène dans l'hémocyanine.

La première série d'expériences avait montré une augmentation du cuivre dans l'animal. Toutefois, les variations de Cu dans l'eau de mer et dans les crustacés sont fonction de causes très diverses et, dans un crustacé comme le crabe, la teneur en Cu semblerait en rapport avec la période d'intermue où il se trouve. De ce fait, les comparaisons sont aléatoires et beaucoup d'erreurs certaines ont été écrites à ce sujet. Le seul moyen d'étudier les variations m'a semblé être l'établissement d'un bilan total, animal + eau, dans un bac en circuit fermé. On est alors sûr de son stock de cuivre au départ, le dosage de Cu étant fait dans un témoin sacrifié dès sa mue terminée et dans l'eau où sera mis un second animal maintenu en vie après sa mue (eau fraîche, n'ayant pas encore reçu d'animal) ; puis on analyse ce second animal, environ 15 jours après, et l'eau où il a vécu. On est certain ainsi de n'avoir aucun apport de cuivre par le milieu extérieur. Jusqu'à présent, on a expérimenté sur des crustacés dans des bacs en circuit ouvert sur la mer et à partir d'un grand nombre d'hypothèses sur le volume d'eau qui passe dans l'animal, sur ce qu'il retient, etc, on s'est livré à des calculs d'un arbitraire évident. Voici le bilan (fig. 1) :

		17 jours après
	A la mue	
Dans les 75 l d'eau.	1,95 mg	4,95 mg
Dans le homard	3,40	5,51
	5,35	10,45



DISCUSSION

Le cuivre a augmenté de près de 2 fois en 17 jours, au total, tandis que dans l'animal, il augmentait de 61 %. Le homard rejette du cuivre dans l'eau qui s'enrichit de 2,5 fois. L'augmentation absolue dans l'animal est de 2,11 mg ; elle est donc supérieure à ce que contenait l'eau au départ : 0,026 mg/l (= 1,95 mg pour 75 l) tandis qu'en fin d'expérience, il y avait 0,066 mg/l (dosage par spectrophotométrie à absorption atomique). Ainsi, là encore, il y a bilan fortement négatif d'un élément, création de cuivre.

Il serait intéressant de voir dans quelle mesure cette augmentation du cuivre est liée

à une transmutation d'un autre élément qui diminuerait. Pour des raisons matérielles, le dosage du fer n'a pas été fait dans les animaux, mais il serait utile de faire ce dosage lors d'une autre recherche, car nous avons de multiples convergences montrant que si Cu augmente, Fe diminue (cela est classique et bien connu des médecins, dans les dosages du sang chez l'homme, ou lors de certaines manifestations pathologiques : maladie de Wilson, etc.). Or, nous avons vérifié, par dosage au spectrophotomètre à absorption atomique, que la teneur du fer baisse dans l'eau où a vécu le homard : Fe est passé de 0,0485 mg/l à 0,069 mg/l (soit, pour 75 litres respectivement de 6,3337/mg à 5,5175) ; c'est une baisse de 18 %.

Toute comparaison précise avec le bilan du cuivre est impossible, du fait que nous ignorons le bilan de Fe dans le homard. Mais en tout cas, le fait, prévisible d'après nos recherches antérieures, d'une baisse de Fe dans l'eau a été confirmé et c'est pourquoi il y a là une donnée intéressante à retenir pour une exploration plus poussée.

Nota. — Il y avait dans cette eau brute (au départ) 3,25 fois plus de Fe que de Cu ; cette proportion est normale ; cette eau était plus riche en cuivre que celle de la première expérience, où il n'y avait que 0,0035 mg/l de Cu et 0,0123 mg/l de Fe, ce qui donne un rapport Fe/Cu de 3,5 donc voisin du précédent (ce serait peut-être là un indice de plus de leur lien que cette constance assez sensible de leur rapport ?). Il y a lieu de remarquer que lors de la seconde expérience, Cu et Fe étaient environ 7 fois plus abondants, mais des variations beaucoup plus importantes sont signalées par d'autres chercheurs. Nous savons que des réserves sont souvent faites sur les teneurs en Cu citées par la littérature spécialisée, car elles sont en général déterminées par des méthodes faciles, mais peu sûres, du fait des faibles teneurs : dosage colorimétrique après addition d'un réactif, directement sur l'eau, sans extraction ; il y a aussi l'aléa d'avoir utilisé un réactif qui ne sort pas tout le cuivre de ses complexes moléculaires biologiques très divers ou même des positions chélatées et on a une valeur trop faible ; c'est là une raison de plus pour avoir utilisé la spectrophotométrie à absorption atomique.

Nous pouvons donc, pour le cuivre, être sûr de nos chiffres montrant que là encore un animal est capable de fabriquer un élément qui entre dans son métabolisme, s'il dispose d'un autre élément déterminé. La confirmation

de l'origine de cet élément dont a besoin l'animal pour faire son cuivre serait intéressante à préciser, pour le homard (et les crustacés) et, par contre-coup, pour toutes les altérations du métabolisme du cuivre chez l'homme, métabolisme encore mal connu, parce qu'on n'avait pas vu ce lien fer-cuivre sous son vrai jour, de sorte qu'on soupçonne un rôle du cuivre dans l'activité de l'hémoglobine, mais il pourrait maintenant faire l'objet de nouvelles recherches, dans l'optique ci-dessus.

Mes travaux antérieurs ne me conduisent pas à penser que le cuivre et le fer, chez l'animal, soient sous une dépendance (catalytique ou autre) du magnésium, ni du calcium (dans les plantes, par contre, au niveau de la chlorophylle il est probable qu'il y a un lien entre Mg et Fe, mais je ne l'ai pas étudié). De ce fait, on pourrait recommencer cette expérience plus facilement, en se servant d'une eau de mer brute, dans laquelle on place un crustacé après sa mue, un autre animal-témoin de même poids ayant été préalablement dosé en Fe et Cu. L'animal (un homard du moins) peut rester une quinzaine de jours sans manger après sa mue; s'il est maintenu en vie plus longtemps, en le nourrissant, il faut tenir compte de l'apport de Fe et de Cu par la nourriture (de la chair de moules en général).

Une autre vérification pourrait être faite, dans la même expérience, sur le phosphore. Toutefois, mes travaux antérieurs ont montré que le phosphore augmente dans l'animal quand on renforce son ingestion en magnésium. Je crois donc qu'il serait utile, dans l'aquarium où l'on met le homard après sa mue, de renforcer l'eau, préalablement, d'un mélange de sels magnésiens solubles et il suffirait (à première vue) d'un mélange de 6 grammes de chlorure cristallisé ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) et 3 grammes de sulfate cristallisé ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) par litre d'eau. Cette opération est vite faite, tandis que si l'on veut étudier le bilan du calcium, il est préférable de préparer une eau carencée en Ca, ce qui est complexe et très long. En tout cas, la carence en Ca ne doit pas être totale, car il faut un peu de calcium à l'animal comme « entraîneur » des réactions à l'intérieur des mitochondries du tissu qui secrète la carapace. Les bilans du phosphore et du cuivre ne nécessitent pas de précipitation (ni décantage, filtrage...) car leur poids total dans l'eau est inférieur à l'accroissement de ces éléments dans l'animal en 15 jours. Il convient cependant de signaler que l'addition de $MgSO_4$

abaisse le pH, les ions $SO_4 = -$, dissociés, apportant une acidification, à compenser par addition de soude qu'on règle au pH-mètre pour équilibrer vers $pH = 7,3$ environ (l'animal est assez tolérant à des variations de plusieurs dixièmes, et d'ailleurs il évolue du fait du métabolisme de l'animal : nous l'avons pu passer de 7,2 à 7,8 en 15 jours; il y a en outre une migration du pH qui vient de ce que cette eau n'a aucun effet tampon, et l'addition de sels, puis de soude peuvent la faire migrer lentement et c'est pourquoi il est préférable de la préparer d'avance). En général, on pourra la préparer à partir du moment où le premier animal a fait sa mue (celui qui est sacrifié comme témoin); le second animal, à peu près de même taille et de même âge, fera sa mue quelques jours ou, au plus, quelques semaines plus tard. Ces animaux, dès qu'ils sont apportés au Centre océanographique, sont mis séparément dans des bacs, car à deux dans le même aquarium, ils se battent et se mutilent, ce qui rend l'expérience impossible (nous avons préféré ne pas leur couper le nerf moteur de la pince, comme le font en général les pêcheurs pour les mettre en vivier et les empêcher de s'entredévorer).

Il convient de remarquer que si l'on veut faire uniquement le bilan du cuivre, il n'y a rien à ajouter à l'eau, donc aucune manipe, au stade biologique.

COMPARAISONS ENTRE LES DEUX SERIES D'EXPERIENCES

Il n'est pas inutile de rapprocher les résultats obtenus sur les animaux (huit ont été utilisés pour différentes comparaisons et observations préalables) lors des deux cycles d'expériences.

Au premier cycle (1967-1968), le homard-témoin pesait, à la mue, 157 grammes (sans son exuvie, qu'il venait de rejeter); au second cycle (1968-1969), il pesait 224 g, soit 42 % de plus (la saison ne nous avait pas permis d'en trouver de plus petits près des pêcheurs et des mareyeurs).

CALCIUM

Le poids du calcium, la première fois, passait de 0,39 g à la mue (chez le témoin analysé alors) à 2,09 g chez l'animal placé dès la fin de sa mue et pendant 13 jours dans de l'eau partiellement carencée en Ca (animal

de même poids que le premier à l'intermue précédente, c'est-à-dire lors de leur capture). Le calcium augmentait ainsi de 5,3 fois dans ce dernier animal, alors que la seconde fois l'augmentation relative du calcium était de 3,4 fois. Ces valeurs sont cependant cohérentes, car le dosage du calcium, dans l'eau finale, nous a donné une teneur plus élevée de Ca dans l'eau la première fois (et c'est cette teneur qui nous a fait douter de l'opération de précipitation de Ca et recommencer une série d'expériences, ainsi que nous l'avons indiqué). Mais de plus, il est normal que l'augmentation relative du calcium soit plus importante pour un petit animal : plus il est petit, plus il grandit relativement vite, c'est-à-dire que plus est grand l'écart relatif de son poids (et de sa taille) entre deux mues consécutives. L'augmentation en poids du calcium, qui est surtout localisé dans l'exosquelette, sera donc, en proportion, plus grande pour le petit animal.

PHOSPHORE

Par contre, l'accroissement du phosphore ne suit pas, en proportion, l'accroissement de la taille de l'animal, puisque la carapace n'est pas un phosphate de calcium, mais un carbonate (calcite). Les valeurs de P ont passé, la première fois, de 270 mg à la mue à 300 mg 13 jours après, soit + 11 %. La seconde fois, il passait de 380 mg à 430, soit + 13 %, mais l'animal est resté dans l'eau 17 jours après sa mue et cela a dû jouer pour constater cette petite augmentation relative de P.

CUIVRE

A la première série, le cuivre passait de 2,4 mg à la mue à 3,0 mg 13 jours plus tard, soit 25 % d'augmentation ; à la seconde série, il passait de 3,4 à 5,51 mg, d'où environ + 61 %. Le fait que le second est resté 4 jours de plus (donc 4/13 de temps de plus, un peu moins d'un tiers) ne semble pas expliquer complètement cet accroissement du taux d'augmentation de Cu. On constate en tout cas que plus l'animal grandit, plus son volume d'hémolymphe, donc d'hémocyanine, est relativement élevé, tout au moins à cette période de sa croissance ; ou peut-être parce qu'en quatre jours de plus, l'animal aurait dépassé le stade de teneur minimale en cuivre ? Une variation du cuivre en fonction du nombre de jours écoulés depuis la mue (courbe en V) a été signalée par ZUCKERKANDL dans sa thèse sur *Maia squinado* (araignée de mer) ; nous

n'avons pas assez d'analyses pour dire que chez le homard, cette variation existe ; nous pouvons en tout cas affirmer qu'il ne s'agit pas d'un phénomène d'échange avec l'eau de mer, contrairement à l'hypothèse gratuite retenue jusqu'ici.

On voit que nos valeurs sont homogènes, compte tenu des différences physiologiques inévitables et cette convergence des mesures dans les deux séries d'expériences donne des ordres de grandeur sur ce qu'on peut prévoir en répétant l'expérience.

MESURES PAR SPECTROPHOTOMETRIE A ABSORPTION ATOMIQUE

Nous croyons utile de donner très succinctement un aperçu de ce qu'est cette nouvelle méthode, une des plus modernes et encore peu connue : l'appareil de Beckman semble avoir été commercialisé en Amérique vers 1966. Nous y avons eu recours pour deux raisons :

— d'une part, recouper les méthodes colorimétriques habituelles utilisant des complexes organiques, souvent délicates quand il s'agit de doser des éléments à très faible concentration, ce qui permettait, du fait de la spécificité, de la sensibilité et de la stabilité de la méthode, d'avoir des chiffres précis à 0,1 gamma/litre près ;

— d'autre part, recouper ces méthodes chimiques par une méthode physique, où tout est automatisé et où le facteur d'appréciation personnelle n'intervient pas, ce qui permet d'écarter l'objection parfois faite — à tort et avec une arrière-pensée non scientifique — que les chimistes font une erreur lorsqu'ils ne trouvent pas des bilans nuls ; nous voulions prouver que les chimistes n'ont pas tort, qu'il faut leur faire confiance dans tous les cas (lorsque les recoupements ont eu lieu, car une erreur humaine exceptionnelle est bien entendu toujours possible). En outre, la méthode spectrophotométrique a l'avantage d'une grande spécificité, il n'y a pas à craindre d'interférences ni d'autres inconvénients ou aléas de certaines méthodes de précipitation chimique. Je pouvais ainsi être absolument sûr de mes chiffres (confirmés cependant, pour apprécier la valeur des méthodes chimiques, par plusieurs dosages colorimétriques effectués par plusieurs opérateurs et plusieurs laboratoires pour bien recouper l'ensemble et ne donner que des valeurs irrécusables).

La méthode de spectrophotométrie à

absorption est en quelque sorte l'inverse de la spectrophotométrie par émission, depuis longtemps utilisée et bien connue; mais cette dernière a l'inconvénient de donner une mesure indirecte; ce qu'on mesure, c'est la longueur d'onde et l'intensité de lumière émise par un atome excité (par une flamme) lorsqu'il revient à sa position initiale; par contre, dans la méthode par absorption, c'est la raie d'absorption qui est analysée directement à travers un monochromateur et un analyseur, d'où plus de sensibilité; la méthode est valable pour les cations.

CONCLUSION

Des résultats, vérifiés sur les animaux, confirment des observations faites sur l'homme et montrent qu'il y a lieu de tenir compte, en biologie, des bilans non nuls, qui ne sont nullement la manifestation d'incompétence des chimistes. Une nouvelle méthode physique de mesure nous permet d'affirmer que les chimistes connaissent leur métier, qu'ils ne se trompent pas quand leurs résultats ne sont pas conformes au postulat d'invariance de la matière en biochimie.

Les plus éminents scientifiques, dont la probité intellectuelle va naturellement de pair avec la valeur, le reconnaissent d'ailleurs et n'accablent pas les chimistes. C'est ainsi que le professeur J.M. PÉRÈS, directeur du Laboratoire océanographique d'Endoume, de la Faculté des sciences de Marseille, a écrit que les Diatomées, en milieu carencé en silice (un total de silice insuffisant) font quand même leur exosquelette de silice. POCHON, chef du service de microbiologie des sols à l'Institut Pasteur de Paris (avec sa collaboratrice H. DE BARJAC) a écrit: « Malgré le nombre considérable de travaux suscités par son étude, la question de la balance azotée des sols pose encore une véritable énigme; quelles que soient les précautions prises quand on fait la différence entre les exportations et les importations d'azote, il y a toujours une portion non retrouvée, importante, variant selon les conditions de 15 à 30 %. » Et il cite quelques expériences, que l'on pourrait étendre, car on trouve de nombreuses citations de ce genre dans la littérature d'ouvrages et de revues du monde entier, pour divers éléments. Il y a donc bien une disparition de l'azote, trop abondante pour résulter d'une erreur, et POCHON ne songe nullement à imputer les causes à des erreurs de chimistes;

il n'en voit pas le mécanisme (1954), mais le phénomène existe, abondamment prouvé par de nombreuses analyses chimiques, « quelles que soient les précautions prises ». POCHON, comme PÉRÈS (et bien d'autres) reconnaissent soit une disparition d'azote, soit une apparition de silicium (de même que REINBERG s'est beaucoup penché sur les bilans non nuls du potassium et déclare explicitement qu'il ne peut s'agir d'erreur).

C'est donc que l'invariance de la matière n'est pas toujours observée en biologie et qu'il nous faut repenser bien des aspects de la pathologie. (L'invariance de la matière, toujours vérifiée en chimie de la matière morte, conduit à des bilans nuls: ce qui est introduit au départ se retrouve en fin d'expérience, sous des formes moléculaires différentes; en biologie on peut avoir un poids plus élevé d'un élément à la sortie qu'à l'entrée, c'est le bilan négatif; en sens inverse, c'est le bilan positif: l'apport est supérieur à ce qu'on retrouve en fin d'expérience).

SUMMARY

A lobster (control) was analyzed directly after the end of the moult; another lobster, of the same weight, was put after the moult in water lacking in calcium (through partial precipitation of Ca), but enriched in magnesium salts (the magnesium was more than doubled).

The water was in a closed circuit and contained a fixed reserve of certain elements. Analysis at the beginning and at the end of the experiments yielded an exact result and showed quantitative variations of the studied elements, which were Ca, P and Cu; the final analysis was made separately on the water and on the animal (also on the sign-lobster) — analysis on the whole animal, after incineration. The animal had been left without food in water for thirteen days in one experiment and for seventeen days in another.

It was 250 % increase in Ca (water + lobster); the animal retained a part and excreted the rest.

The phosphorus rose by 13 per cent in the animal but did not vary in the water (75 liters).

The copper (water + lobster) increased by 95 % (61,7 % in the animal). The increase in the animal for P and Cu was higher than the total at the start in water. It is to be noted that the Cu increase is related to a Fe decrease, expected and found. (Fe diminution in the water by 18 %). There are therefore non-zero results in biology, and we must take this data into account in the study of all living matter. The law of invariability of matter is not always true in biology, which can only be explained by transmutation, an unknown physico-biological process, the results of which are noticeable without any shadow of doubt.

Breeding and observation of the lobsters at the Oceanographic Center of G. Bolloré, Odet, near Quimper (Brittany).