

Reçu le 20 janvier 1954.

ACTION VITAMINIQUE DE LA « DL-DICARNITINE »
CHEZ « TENEBRIO MOLITOR L. »
(INSECTE, COLÉOPTÈRE)

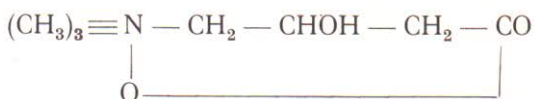
PAR

JEAN LECLERCQ

(Université de Liège, Institut Léon Fredericq, Chimie physiologique)

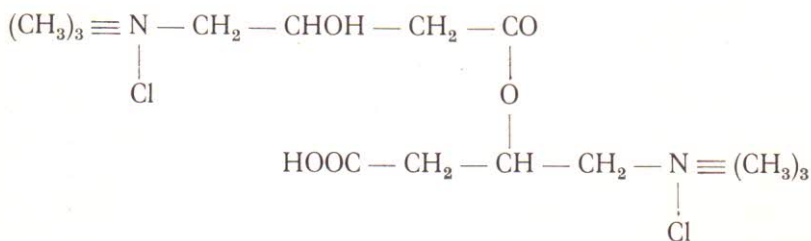
(2 figures)

G. FRAENKEL et ses collaborateurs (1948-1953) ont montré que les larves de *Tenebrio molitor* ont besoin pour leur croissance d'une vitamine hydrosoluble particulière qui n'est autre que la carnitine (β -hydroxybutyrobétaïne) :



découverte dès 1905 par W. GULEWITSCH et R. KRIMBERG dans les extraits de viande. Privées de cette vitamine, les jeunes larves de *Tenebrio molitor* soumises *ab ovo* à un régime synthétique, cessent de croître et meurent peu après la 4^e ou la 5^e semaine suivant leur éclosion.

F. BINON (1) a récemment préparé par synthèse un dimère nouveau dans lequel la fonction alcool d'une molécule de carnitine est estérifiée par la fonction acide d'une autre molécule :



(1) F. BINON, communication personnelle. Le mode de préparation et les propriétés de la « dicarnitine » seront présentés sous peu dans les *Bull. Acad. Sci. Paris*. Je tiens à remercier les Laboratoires Labaz (Bruxelles) qui ont mis à ma disposition ce produit synthétisé par M. F. BINON.

Ce dérivé (« *dl*-dicarnitine ») est parfaitement stable, se transforme beaucoup plus difficilement en bêtaïne crotonique et est beaucoup moins hygroscopique que la carnitine naturelle.

Le présent travail a été entrepris dans le but de vérifier si la « dicarnitine » jouit des mêmes propriétés vitaminiques pour *Tenebrio molitor* que la carnitine utilisée par G. FRAENKEL. Il était aussi intéressant de savoir si les deux races de *Tenebrio molitor* précédemment décrites (J. LECLERCQ, 1950, 1954) réagiraient de façon identique à la présence de ce facteur dans des milieux nutritifs synthétiques préparés dans des conditions comparables à celles de G. FRAENKEL (1950).

Dispositions expérimentales

Les élevages ont été réalisés à 27° C. (extrêmes thermiques exceptionnels : 26 et 28° C.) et à ± 75 % d'humidité relative. Les œufs de *Tenebrio molitor* de race F ou G sont récoltés et mis en incubation dans des conditions telles qu'aucune larve ne puisse tirer profit de traces de farine, ni même dévorer la coque de son œuf (cf. J. LECLERCQ, 1948, p. 330). Toutes les larves ont été élevées isolément pour éviter l'interférence du cannibalisme (cf. J. LECLERCQ, 1950) et pour permettre de comparer les particularités de la croissance individuelle.

Le milieu nutritif témoin, ne contenant pas de « dicarnitine » comprenait, pour 103 g. de produit sec :

caséine (« vitamin free, Labco)	20	g.
glucose anhydre	80	g
cholestérol	1	g.
McCollumn's salt mixture	2	g.

et les vitamines suivantes, par g. de produit sec :

thiamine	25	μ g.
riboflavine	12.5	μ g.
acide nicotinique	25	μ g.
pantothénate de calcium	25	μ g.
pyridoxine	12.5	μ g.
acide folique	2.5	μ g.
biotine	5	μ g.
chlorure de choline	500	μ g.

La composition du milieu ci-dessus est celle de G. FRAENKEL, M. BLEWETT et M. COLES (1950, p. 93) et de G. FRAENKEL (1953) sauf que :

a) L'inositol et l'acide para-aminobenzoïque ont été omis, G. FRAENKEL, M. BLEWETT et M. COLES (1950) ayant conclu que rien ne suggère leur nécessité.

b) La quantité de biotine utilisée a été de 5 $\mu\text{g.}$ au lieu de 0.25 $\mu\text{g./g.}$ Une dose aussi élevée serait toxique pour *Tribolium confusum* (cf. G. FRAENKEL et M. BLEWETT, 1943); des essais préliminaires ont montré qu'elle ne l'est certainement pas au même degré pour *Tenebrio*. Cette dose superoptimale a été employée parce que certains essais antérieurs avaient fait suggérer que les quantités de biotine inférieures au $\mu\text{g./g.}$ pourraient se répartir difficilement dans les régimes synthétiques secs, ce qui rendrait compte de certains échecs.

c) La quantité d'acide nicotinique (25 $\mu\text{g./g.}$) est celle que G. FRAENKEL, M. BLEWETT et M. COLES utilisèrent en 1950 et non celle prescrite par G. FRAENKEL en 1953 (50 $\mu\text{g./g.}$). Cette dose avait été choisie avant de prendre connaissance des résultats de G. FRAENKEL et H. R. STERN (1951) suggérant que la dose optimale d'acide nicotinique dans un milieu contenant 20 % de caséine est d'environ 50 $\mu\text{g./g.}$

Tous les ingrédients, sauf la choline, ont été pesés et mélangés intimement (homogénéisation pendant 6 heures à l'agitateur rotatif à basculement, puis pulvérisation au micromoulin Culatti, puis mélange au mortier, puis agitation pendant une heure à l'agitateur rotatif). Chaque tube d'élevage a reçu 5 g. de ce mélange sec et homogénéisé auxquels furent ajoutés 0.5 cc. H_2O distillée + le chlorure de choline. Les tubes furent ensuite exposés pendant quelques jours dans une étuve à 27° C. et 75 % H. R., puis leur contenu fut réhomogénéisé et pulvérisé au micro-moulin Culatti.

Préparé dans ces conditions, le milieu semble avoir été parfaitement homogénéisé, aucune fermentation n'a pu s'y produire, les acides aminés de la caséine n'ont pas réagi avec le glucose, celui-ci n'a pas « caramélisé », et la teneur en eau s'est stabilisée à 10-12 %, ce qui correspond au taux d'hydratation habituel de la plupart des farines attaquées par *Tenebrio*.

Les milieux nutritifs synthétiques contenant de la « dicarnitine » ont été préparés exactement de la même façon sauf que les

0.5 cc. d'H₂O distillée contenaient, outre la choline, 4 µg. de « dicarnitine », soit 0.8 µg./g.

Résultats

A. — OBSERVATIONS SUR LES LARVES

Les données relatives à la mortalité et à la longévité larvaires sont présentées graphiquement dans la figure 1.

Toutes les larves témoins (privées de carnitine) sont mortes avant la fin de la 10^e semaine, la plupart entre la 4^e et la 6^e semaine. Si on excepte les quelques larvules mortes pendant la première quinzaine (2 pour la race F et 2 pour la race G), les larves sont mortes peu après une mue (la 3^e ou la 4^e ?) et ont pris un aspect qui paraît caractéristique de la carence en carnitine (larves blanches ou brun clair, recourbées et cassantes).

Bien que cela reste possible, on ne peut conclure actuellement à une différence entre les graphiques de mortalité des deux races F et G.

Les larves qui reçurent de la « dicarnitine » se sont comportées comme suit :

1) 9 larves sur 44 de la race F (soit environ 20 %) et 39 larves sur 66 de la race G (soit environ 65 %) sont mortes avant d'avoir atteint la 10^e semaine. On observera que la mortalité précoce (1) fut nettement plus élevée chez la race G que chez la race F. Ce ne fut pas toujours le cas dans nos essais antérieurs d'élevage dans des milieux artificiels (cf. J. LECLERCQ, 1950). Mais cette constatation devrait être vérifiée dans un plus grand nombre d'essais car la mortalité précoce (1) varie beaucoup suivant les pontes, ainsi que nous le montrerons prochainement.

Chez les deux races, la plupart des larves qui moururent entre la 4^e et la 10^e semaine venaient de muer, ne s'étaient pas mélanisées à nouveau et présentaient l'aspect décrit ci-dessus.

2) Les autres larves (35 pour la race F et 27 pour la race G) ont survécu avec des chances diverses. 16 larves de la race F et 11 de la race G ont poursuivi leur croissance jusqu'aux métamorphoses. La mortalité larvaire postérieure à la 10^e semaine fut donc du même ordre d'importance pour les deux races (54 et 59 %).

(1) Nous entendons par « mortalité précoce » celle qui se produit avant la 3^e ou 4^e semaine et affecte des larvules qui n'ont pas grandi et ont mué au plus une fois.

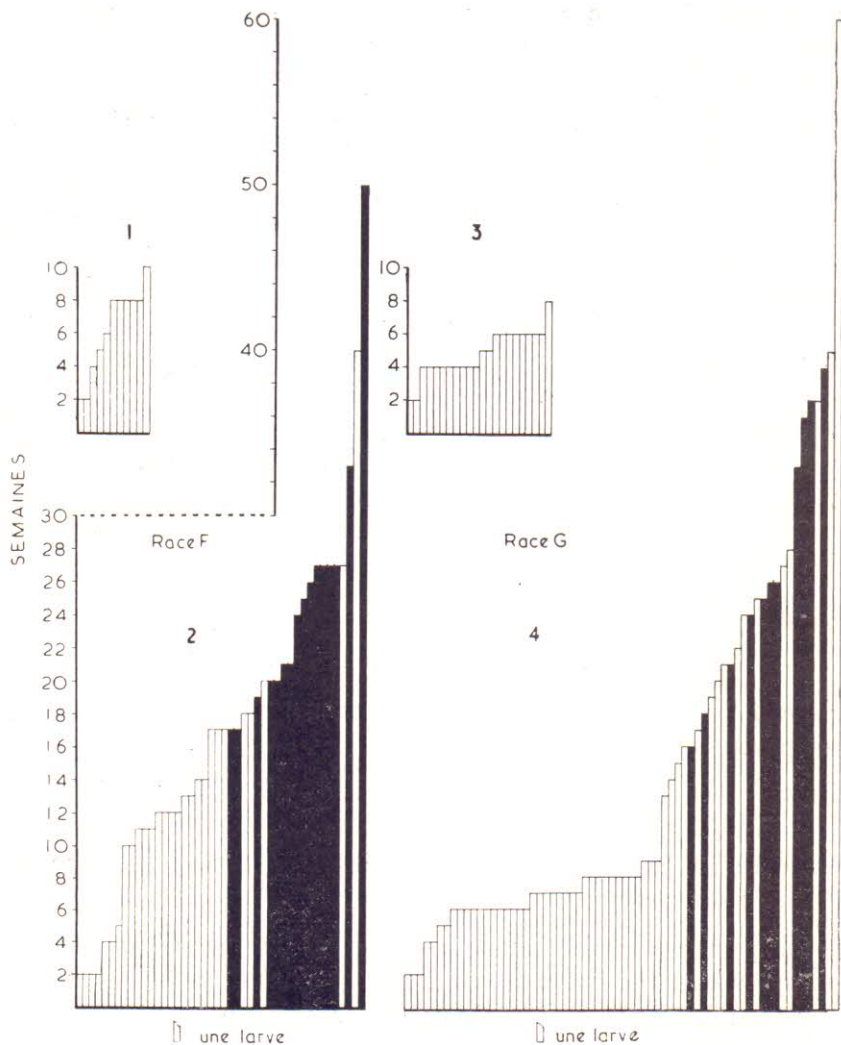


FIG. 1. — Elevages individuels de larves de *Tenebrio molitor* (races F et G) dans un milieu nutritif synthétique avec (nos 2,4) ou sans *dl*-dicarnitine (nos 1,3). Chaque rectangle représente un individu, le rectangle est noirci lorsque cet individu a réussi à atteindre le stade nymphal.

Les cadavres récoltés après la 10^e semaine avaient des tailles et des aspects divers. La plupart étaient brun foncé ou noir et plus ou moins mous. Ils ressemblaient à ceux qu'on récolte en moins grand nombre dans les élevages avec des farines de céréales. On peut donc croire que

cette mortalité en cours de croissance active n'est pas le résultat d'une simple carence en carnitine.

3) 26 sur 27 des larves qui ont atteint le stade nymphal ont effectué leur croissance dans des délais variant entre 16 et 39 semaines (en moyenne : 22.7 semaines soit \pm 159 jours pour la race F et 27.3 semaines soit \pm 191 jours pour la race G). Ces délais sont sensiblement plus longs que ceux qu'on observe en élevant isolément des larves dans de la farine de froment (cf. J. LECLERCQ, 1954b) ; ils sont du même ordre de grandeur que ceux qu'on obtient en élevant des larves en colonies relativement peuplées dans de la farine de froment (cf. J. LECLERCQ, 1954a). Une seule larve (de la race F) a mis un temps anormalement long (50 semaines) pour se transformer en nymphe mais de telles aberrations se rencontrent aussi occasionnellement dans les élevages même individuels avec des farines de céréales.

On peut donc conclure dès à présent que la *dl*-dicarnitine de synthèse possède une action vitaminique comparable à celle de la carnitine naturelle.

B. — OBSERVATIONS SUR LES NYMPHES

Les 27 nymphes obtenues dans les élevages précités ont présenté les poids suivants :

Race F : 71, 74, 88, 91, 95, 97, 98, 99, 101, 107, 109, 116, 117, 120 et 131 mg., soit en moyenne : 100 mg.

Race G : 70, 84, 110, 140, 151, 170, 181, 187, 205, 212, 215 mg., soit en moyenne : 157 mg.

Ces poids sont sensiblement inférieurs à ceux que présentent les nymphes issues de larves élevées isolément dans de la farine de froment (cf. J. LECLERCQ, 1954b) ; ils sont du même ordre de grandeur que ceux des nymphes obtenues dans des colonies modérément peuplées nourries de farine de froment (cf. J. LECLERCQ, 1954a).

Mais les nymphes des deux races n'ont pas effectué leur transformation en adulte avec le même succès. Presque toutes les nymphes de la race G (2 exceptions) ont livré un adulte mâle ou femelle absolument normal. On a pu vérifier que ces adultes sont fertiles et que leur progéniture survit normalement. Par contre, presque toutes les larves de la race F (2 exceptions) ont livré des adultes anormaux (cf. fig. 2).

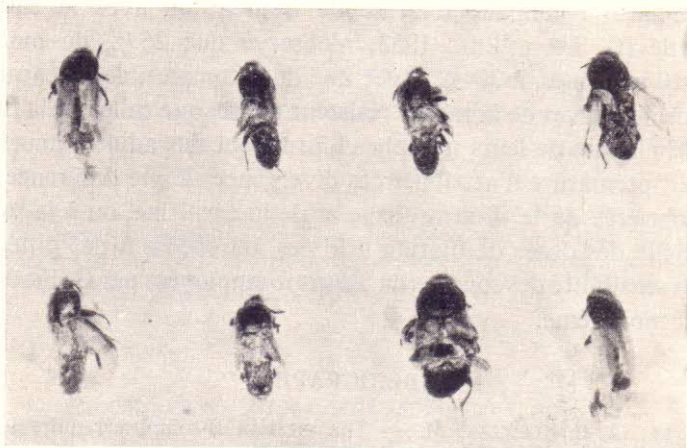


FIG. 2. — Adultes anormaux de la race F obtenus dans les milieux nutritifs synthétiques.

De telles anomalies s'observent occasionnellement dans les élevages nourris de farine de froment, mais elles sont rares dans les conditions normales (moins de 4 %). On obtient des anomalies du même type plus fréquentes lorsque les colonies sont surpeuplées (je suppose qu'en ce cas les malformations résultent de blessures infligées aux pré-nymphes et aux nymphes par leurs congénères). On en obtient aussi dans les élevages réalisés dans l'air trop sec ou trop humide (cf. J. LECLERCQ, 1948). Mais dans ces divers cas, les adultes malformés survivent habituellement plusieurs jours ou plusieurs semaines tandis que les 13 adultes anormaux fournis par la race F et les 2 adultes anormaux fournis par la race G sont tous morts juste après leur éclosion.

Conclusions

Dans les conditions expérimentales utilisées, la «*dl*-dicarnitine » de synthèse, fournie à raison de 0.8 μ g. par g. de milieu nutritif synthétique sec, joue le rôle de la carnitine naturelle étudiée par G. FRAENKEL et permet à un certain nombre de larvules de *Tenebrio molitor* des races F et G d'effectuer une croissance complète depuis l'éclosion jusqu'aux métamorphoses.

Toutefois la mortalité est nettement plus forte avec la «*dl*-dicarnitine » (35 à 60 % endéans les 10 premières semaines) qu'avec un

milieu naturel comme la farine de froment ou avec la carnitine naturelle (G. FRAENKEL, 1953, n'observe que 25 % de mortalité après 10 semaines, à 30° C., avec une dose comparable de carnitine). De plus, les larves de la race F résistent mieux que celles de la race G, mais la plupart de leurs nymphes fournissent des adultes anormaux. Il serait prématuré d'attribuer ces divergences à une différence entre les propriétés de la *dl*-dicarnitine et de la carnitine, ou à la toxicité éventuelle des doses de biotine utilisées, ou encore à des différences dans la sensibilité des souches de *Tenebrio* employées par G. FRAENKEL et par moi-même.

BIBLIOGRAPHIE

- FRAENKEL, G. et BLEWETT, M. — The vitamin B-complex requirements of several Insects. *Biochem. J.*, 1943, **37**, 686.
- FRAENKEL, G., BLEWETT, M. et COLES, M. — Br, a new vitamin of the B-group and its relation to the folic acid group and other anti-anaemia factors. *Nature*, 1948, **161**, 981.
- FRAENKEL, G., BLEWETT, M. et COLES, M. — The nutrition of the Mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Physiol. Zoöl*, 1950, **23**, 92.
- FRAENKEL, G. et STERN, H. R. — The nicotinic acid requirements of two Insects species in relation to the protein content of their diets. *Arch. Biochem.*, 1951, **30**, 438.
- FRAENKEL, G. — Effect and distribution of vitamin B_T. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **34**, 457.
- FRAENKEL, G. — Isolation procedures and certain properties of vitamin B_T. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **34**, 468.
- FRAENKEL, G., CARTER, H. E., BHATTACHARYYA, P. K. et WEIDMAN, K. R. — Chemical studies on vitamin B_T. Isolation and characterization as carnitine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **38**, 405.
- FRAENKEL, G. — Studies on the distribution of vitamin B_T (carnitine). *Biol. Bull.*, 1953, **104**, 359.
- GULEWITSCH, W. et KRIMBERG, R. — Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung über Carnitin. *Z. Physiol. Chem.*, 1905, **45**, 326.
- LECLERCQ, J. — Influence des conditions hygrométriques sur les larves, les nymphes et les adultes de *Tenebrio molitor* L. *Arch. internat. Physiol.*, 1948, **55**, 366.
- LECLERCQ, J. — Sur les besoins nutritifs de la larve de *Tenebrio molitor* L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, **2**, 329.
- LECLERCQ, J. — Ecologie et physiologie des populations de *Tenebrio molitor* L. *Physiol. Compar. Oecol.*, 1950, **2**, 161.
- LECLERCQ, J. — Nouvelles recherches sur la variabilité des *Tenebrio molitor* L. et *obscurus* F. *Physiol. Compar. Oecol.*, 1954a, **4** (sous presse).
- LECLERCQ, J. — Recherche de sous-races bionomiques chez *Tenebrio molitor* L. *Physiol. Compar. Oecol.*, 1954b, **4** (sous presse).